

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**TESIS DOCTORAL**

**Papel del sensor metabólico pas quinasa en el estrés oxidativo  
y el envejecimiento**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Pilar Dongil Sánchez**

**Directoras**

**Elvira Álvarez García**  
**María del Carmen Sanz Miguel**  
**Verónica Hurtado Carneiro**

**Madrid, 2019**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**PAPEL DEL SENSOR METABÓLICO PAS QUINASA EN EL  
ESTRÉS OXIDATIVO Y EL ENVEJECIMIENTO**

**PILAR DONGIL SÁNCHEZ**

MADRID, 2018

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**PAPEL DEL SENSOR METABÓLICO PAS QUINASA EN EL  
ESTRÉS OXIDATIVO Y EL ENVEJECIMIENTO**

MEMORIA PRESENTADA POR

**PILAR DONGIL SÁNCHEZ**

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DRA. ELVIRA ÁLVAREZ GARCÍA

DRA. MARÍA DEL CARMEN SANZ MIGUEL

DRA. VERÓNICA HURTADO CARNEIRO

MADRID, 2018







Dña. **ELVIRA ÁLVAREZ GARCÍA**, profesora titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

Dña. **MARÍA DEL CARMEN SANZ MIGUEL**, profesora contratada doctora del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y

Dña. **VERÓNICA HURTADO CARNEIRO**, contratada por el Centro de Investigación Biomédica en Red Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)

**CERTIFICAN:**

Que la graduada Dña. **Pilar Dongil Sánchez** ha alcanzado la formación y los conocimientos suficientes durante el período de doctorado para la realización del trabajo titulado: "**PAPEL DEL SENSOR METABÓLICO PAS QUINASA EN EL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL ENVEJECIMIENTO**", bajo nuestra dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid para optar al grado de Doctor.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expiden el presente certificado en Madrid, a 23 de Febrero de 2018.

VºBº de los Directores

Fdo.: Dra. Elvira Álvarez García

Fdo.: Dra. María del Carmen Sanz Miguel

Fdo.: Dra. Verónica Hurtado Carneiro



*Observa constantemente todas aquellas cosas que toman lugar  
por el cambio, y acostúmbrate a pensar que nada ama  
tanto la naturaleza del universo como cambiar las cosas existentes  
y crear nuevas cosas semejantes*

Marco Aurelio



---

*AGRADECIMIENTOS*



*Después de estos 4 años por fin estoy en mi recta final y quería pararme un rato para agradecer a todas aquellas personas que de una forma u otra han hecho posible que realice esta tesis doctoral.*

*En primer lugar, quería agradecer a mis directoras de tesis, la Dra. Elvira Álvarez, la Dra. Carmen Sanz y la Dra. Verónica Hurtado por darme la oportunidad de realizar con ellas la tesis doctoral, de enseñarme tanto en tan poco tiempo con paciencia, optimismo y humildad.*

*También quería agradecer a los profesores y técnicos del departamento de Bioquímica y Biología molecular de la Facultad de Medicina que de una manera u otra han contribuido a la elaboración de esta tesis.*

*Al Dr. Enrique Blázquez por haberme ofrecido la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación.*

*Al Dr. Santiago Lamas y a todos los miembros de su grupo, por enseñarme el apasionante mundo de los miARNs y por acogerme como una más durante las semanas que estuve en el CBMSO.*

*A la Dra. Yolanda Loarce por enseñarme lo que es realmente “amar la ciencia”, por haber confiado en mí desde el primer momento.*

*En segundo lugar, a Ana, mi compañera, amiga, gracias por tus consejos, por tu apoyo y por tu optimismo, porque durante estos 4 años juntas hemos podido superar cualquier obstáculo para llegar a alcanzar nuestro sueño.*

*A mis compañeros de comidas y terrazas: Nuria, Ángel y Yannick, gracias por esas comidas de risas, anécdotas y debates, haciendo los días más apacibles.*

*A mis amigos de la infancia: Alex, Sara, Gonzalo, Nacho y Diego, gracias por vuestro apoyo y paciencia durante estos años y por estar ahí siempre.*

*A los futuros Dres. Pablo y Luis, gracias por vuestras extensas conversaciones acerca del mundo de los sueños, los ruidos y la estadística.*



## *Agradecimientos*

---

*A Fernando y a todos los miembros de “Multiaventura”, gracias por vuestro apoyo y por esas quedadas imprescindibles en el “Pico”.*

*A Héctor, gracias por estar siempre ahí, a pesar de que estemos en la distancia.*

*Y por último quiero agradecer, en general, a toda mi familia por todo el cariño recibido, pero en especial:*

*A mis padres, gracias por vuestra humildad, por todo el esfuerzo, por vuestra lucha y sacrificio que habéis tenido que hacer para que en el día de hoy esté finalizando esta tesis, gracias por creer en mí desde el principio.*

*A mi hermano y a Ana por ser mis confidentes este tiempo, gracias por vuestra fuerza, sabiduría y madurez, por confiar en mí.*

*Y a Borja, gracias por aguantarme y ayudarme todo este tiempo, por animarme a perseguir mis sueños, gracias por quererme tanto y hacerme tan feliz desde el primer día...un trocito de esta tesis es tuyo.*





<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>21</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>27</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>33</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>39</b>
1. PAS QUINASA .....	41
1.1. Estructura de la PAS quinasa .....	41
1.2. Modelo de activación de la PAS quinasa .....	42
1.3. Localización subcelular y expresión .....	44
1.4. Funciones y regulación de PAS quinasa en el metabolismo de mamíferos.....	44
1.4.1. Papel de PAS quinasa en el metabolismo y control de la homeostasis de glucosa ...	44
1.4.2. Papel de PAS quinasa en el metabolismo lipídico .....	46
1.4.3. Papel de PAS quinasa en el metabolismo oxidativo.....	47
2. HISTOFISIOLOGÍA DEL HÍGADO .....	48
2.1. Funciones hepáticas.....	49
2.1.1. Funciones metabólicas del hígado .....	49
2.1.2. El Hígado: un potente desintoxicante .....	50
2.1.2.1 Neutralización del exceso de radicales libres por el hígado.....	50
3. LA MITOCONDRIA Y SU PAPEL EN LA GENERACIÓN Y EL CONTROL DE LOS RADICALES LIBRES.....	51
3.1. Morfología y Estructura .....	51
3.2. Funciones mitocondriales .....	53
3.3. Metabolismo mitocondrial .....	53
3.3.1. Transporte electrónico y fosforilación oxidativa mitocondrial .....	53
3.4. Regulación de la calidad y la función mitocondrial: dinámica mitocondrial .....	56
4. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS).....	58
4.1. Generación de ROS mitocondrial.....	59
4.2. Sistemas de defensa antioxidante .....	62
4.3. Funciones de ROS como moléculas de señalización celular .....	62
4.3.1. Acción y secreción de la insulina .....	62
4.3.2. Regulación de transportadores y canales iónicos .....	63
4.3.3. Adhesión y expansión celular.....	63
4.3.4. ROS como regulador del pH celular .....	63
4.3.5. Proliferación celular .....	63

4.4. Desregulación del sistema ROS/enzimas antioxidantes. Estrés Oxidativo .....	64
4.4.1. Mecanismos de regulación frente al estrés oxidativo .....	64
4.4.1.1. Regulación transcripcional.....	64
4.4.1.2. Regulación por proteínas desacetilasas.....	68
4.4.1.3. Regulación por proteínas quinasas.....	69
4.4.1.4. Regulación por miARNs .....	70
4.4.2. Enfermedades asociadas al estrés oxidativo .....	71
5. EL ENVEJECIMIENTO.....	72
5.1. El envejecimiento y su relación con el estrés oxidativo.....	72
5.2. Alteraciones metabólicas asociadas al envejecimiento: diabetes tipo 2.....	73
5.3. El envejecimiento en el hígado .....	73
6. PÉPTIDO SIMILAR AL GLUCAGÓN TIPO 1 (GLP-1) Y SU IMPLICACIÓN EN EL ESTRÉS OXIDATIVO .....	74
6.1. Síntesis y procesamiento del proglucagón.....	74
6.2. Péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) .....	75
6.2.1. Secreción y degradación del GLP-1 .....	75
6.2.2. Mecanismo de acción del GLP-1.....	76
6.2.3. Efectos fisiológicos del GLP-1 .....	76
6.3. El Papel del GLP-1 en el estrés oxidativo .....	78
6.4. Implicación del GLP-1 en el envejecimiento .....	79
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>81</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>85</b>
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	87
1.1. Generación de ratones deficientes en PASK ( <i>Pask</i> <sup>-/-</sup> ).....	87
2. EXPERIMENTOS <i>in vivo</i> .....	88
2.1. Análisis de la actividad metabólica de los ratones.....	88
2.2. Medida del peso corporal en ratones a distintas edades .....	89
2.3. Test de tolerancia a glucosa (TTG) e insulina (TTI).....	89
2.4. Tratamientos de los ratones: ayuno/alimentación y exendina-4 .....	90
3. TÉCNICAS <i>in vitro</i> .....	90
3.1. Estudio de algunos parámetros bioquímicos .....	90
3.1.1. Valoración de la concentración de insulina en plasma .....	90
3.1.2. Valoración de la concentración plasmática de GLP-1 .....	91

3.1.3. Estudio del perfil lipídico .....	92
3.2. Técnicas biomoleculares en células (MEFs) e Hígado.....	93
3.2.1. Aislamiento, Cultivo y Tratamientos de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) 93	
3.2.2. Homogenización de las muestras de hígado de ratón .....	93
3.2.3. Determinación de la concentración de proteína .....	94
3.2.4. Identificación y caracterización de proteínas mediante Western blot .....	95
3.2.5. Extracción del ARN total a partir de hígado y síntesis del ADNc.....	97
3.2.5.1. Medida de la concentración y pureza del ARN .....	97
3.2.5.2. Síntesis de ADNc: Retrotranscripción (RT) .....	98
3.2.6. Amplificación del ADNc: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).....	98
3.2.7. Análisis de expresión de miARNs .....	101
3.2.7.1. Extracción y medida de la concentración del ARN .....	101
3.2.7.2. Síntesis del ADNc: Transcripción Reversa.....	102
3.2.7.3. PCR a tiempo real (SYBR Green ® Assay) .....	102
3.2.8. Cuantificación del ADN mitocondrial por qRT-PCR .....	103
3.2.9. Inmunohistoquímica .....	103
4. OTRAS TÉCNICAS .....	105
4.1. Visualización <i>in vivo</i> de mitocondrias de las células MEFs (®MitoTracker) .....	105
4.2. Visualización de mitocondrias hepáticas al microscopio electrónico de transmisión (MET) .....	105
4.3. Determinación del contenido de ATP .....	106
4.3.1 Medida del contenido del ATP celular en MEFs.....	106
4.3.2. Medida del contenido del ATP hepático .....	107
4.4. Determinación del contenido de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	107
4.4.1. Medida del contenido de ROS en MEFs .....	107
4.4.2. Medida del contenido de ROS/RNS hepático.....	108
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	109
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>111</b>
1. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE PASK SOBRE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL, LA GENERACIÓN DE ROS Y LOS MECANISMOS ANTIOXIDANTES Y DE SUPERVIVENCIA CELULAR.....	113
1.1. La expresión del ARNm codificante para la proteína PASK funcional está bloqueada en los ratones <i>Pask</i> <sup>-/-</sup> .....	113
1.2. La producción de ATP y ROS en hígado disminuye en los ratones deficientes en PASK en condición basal, y permanece inalterada en ayuno .....	114

1.3. La deficiencia de PASK en MEFs potencia la producción de ROS, pero mejora la respuesta protectora frente al estrés oxidativo .....	115
1.4. Las mitocondrias de los MEFs deficientes en PASK muestran una dinámica alterada ...	117
1.5. Los hepatocitos de los ratones deficientes en PASK muestran menor número de mitocondrias y alteraciones morfológicas .....	118
1.6. La deficiencia de PASK estimula la expresión de varios genes hepáticos implicados en la biogénesis mitocondrial y eleva el contenido de ADN mitocondrial .....	120
1.7. Los niveles de las proteínas PGC-1 $\alpha$ y COX-IV no se encuentran alterados en los ratones <i>Pask</i> <sup>-/-</sup> .....	122
1.8. La deficiencia de PASK incrementa la expresión hepática de <i>Sirt-1</i> y su localización subcelular es mayoritariamente nuclear .....	123
1.9. La deficiencia de PASK regula la expresión hepática de <i>FoxO3a</i> y <i>p53</i> , involucrados en mecanismos de supervivencia y reparación celular.....	125
1.10. La deficiencia de PASK induce la expresión de enzimas antioxidantes .....	126
1.11. La deficiencia de PASK altera los niveles de las proteínas SOD-Mn y p53 .....	128
1.12. La deficiencia de PASK altera la expresión de NRF2, GCLm y miR-433, implicados en el control del estado redox celular .....	129
1.13. La deficiencia de PASK activa la proteína Akt en condición de ayuno .....	131
1.14. La deficiencia de PASK estimula la activación de ERK1/2 y PCNA.....	132
2. EL EFECTO DE LA EXENDINA-4 EN LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>Pask</i> Y EN EL ESTRES OXIDATIVO, E IMPORTANCIA DE PASK EN LA SEÑALIZACIÓN DE GLP-1 EN EL HÍGADO .....	133
2.1. La exendina-4 inhibe la expresión hepática del gen <i>Pask</i> .....	133
2.2. La deficiencia de PASK altera los niveles endógenos de GLP-1.....	134
2.3. La exendina-4 reduce la producción de ROS e incrementa la expresión génica de algunas enzimas antioxidantes.....	135
2.4. La exendina-4 promueve la expresión hepática de <i>Ppar-<math>\gamma</math></i> y <i>Cox-IV</i> e inhibe la de <i>Nrf2</i> , <i>Gclm</i> , <i>Sirt-1</i> y <i>Cs</i> , dependiendo del estado nutricional .....	137
2.5. La respuesta a nivel transcripcional y traduccional de PGC-1 $\alpha$ a la exendina-4 es diferente. Posible implicación del miR-433 en la respuesta a la exendina-4.....	138
2.6. La exendina-4 aumenta los niveles proteicos de NRF2 y COX-IV, siendo dependiente de PASK .....	141
2.7. La deficiencia de PASK estimula los niveles proteicos de PCNA y p53, y el tratamiento con exendina-4 potencia este efecto, dependiendo del estado nutricional .....	142
3. IMPLICACIÓN DE PASK EN EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO.....	143
3.1. La expresión hepática del gen <i>Pask</i> va disminuyendo durante el envejecimiento.....	143
3.2. Los ratones envejecidos deficientes en PASK no desarrollan hiperglucemia e hiperinsulinemia, como consecuencia de la resistencia a la acción de la insulina .....	144
3.3. Los ratones <i>Pask</i> <sup>-/-</sup> viejos tienden a disminuir su peso corporal y muestran mejor perfil lipídico .....	147

3.4. Los ratones <i>Pask</i> <sup>-/-</sup> muestran un elevado rendimiento energético .....	149
3.5. Los ratones <i>Pask</i> <sup>-/-</sup> viejos mantienen bajos los niveles de ROS en rangos similares a los WT jóvenes.....	150
3.6. La expresión hepática de varios genes implicados en la biogénesis y la función mitocondrial, y el contenido de ADN mitocondrial están alterados en el proceso de envejecimiento .....	151
3.7. Los niveles proteicos de PGC-1 $\alpha$ , COX-IV y SIRT-1 se encuentran alterados en los ratones envejecidos, pero en menor medida en los ratones deficientes en PASK, bajo condiciones de ayuno .....	153
3.8. Los ratones <i>Pask</i> <sup>-/-</sup> viejos disminuyen menos la expresión de las enzimas antioxidantes, que desciende con la edad .....	154
3.9. La deficiencia de PASK aumenta los niveles proteicos de NRF2 y la expresión hepática de <i>Ho-1</i> , <i>Gclc</i> y <i>Gclm</i> en los ratones envejecidos .....	155
3.10. La expresión basal del miR-433 está alterada en el proceso de envejecimiento .....	156
3.11. La expresión hepática de <i>FoxO3a</i> y <i>p53</i> está modulada en el proceso de envejecimiento, siendo dependiente de PASK .....	157
3.12. Los ratones <i>Pask</i> <sup>-/-</sup> viejos muestran alterados los niveles de las proteínas Akt activada, p53 y PCNA, implicadas en mecanismos apoptóticos, supervivencia celular y de reparación del ADN .....	158
4. EFECTOS DEL GLP-1 EN EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO .....	161
4.1. Los niveles endógenos de GLP-1 disminuyen en el proceso de envejecimiento.....	161
4.2. La expresión hepática del receptor del GLP-1 se suprime en el proceso de envejecimiento .....	161
4.3. La exendina-4 inhibe la expresión hepática de <i>Pgc-1<math>\alpha</math></i> y <i>Nrf2</i> en los ratones viejos deficientes en PASK .....	162
4.4. La exendina-4 pierde su efecto antioxidante en el proceso de envejecimiento, pero, en menor medida en los ratones deficientes en PASK .....	164
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>167</b>
1. PAPEL DE LA PASK EN LA HOMEOSTASIS REDOX DEL HÍGADO.....	170
2. IMPLICACIÓN DE LA PASK EN SUPERVIVENCIA Y PROTECCIÓN FRENTE AL ESTRÉS CELULAR	176
3. PARTICIPACIÓN DE LA PASK EN LA ACCIÓN REGULADORA DE LA EXENDINA-4 EN EL METABOLISMO OXIDATIVO .....	185
4. FUNCIÓN DEL SENSOR METABÓLICO PASK EN EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO .....	191
5. IMPLICACIÓN DE LA PASK EN LA ACCIÓN REGULADORA DE LA EXENDINA-4 EN EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO .....	201
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>205</b>



<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>209</b>
--------------------------	------------

<b>ANEXOS.....</b>	<b>225</b>
--------------------	------------





<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ADNmt</b>	ADN mitocondrial
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>Akt</b>	Proteína quinasa B. También denominada PKB
<b>AMPC</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>AMPK</b>	Proteína quinasa dependiente de AMP
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>COX-IV</b>	Citocromo c oxidasa, subunidad IV
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidina- 2- fenilindol
<b>DCF</b>	2'-7'-Diclorofluoresceína
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado por Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DPP-4</b>	Dipeptidil peptidasa-4
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>ERK</b>	Quinasa regulada por señales extracelulares
<b>ETC</b>	Cadena de transporte electrónico
<b>EXE-4</b>	Exendina-4
<b>FAD</b>	Flavín adenín dinucleótido
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>Fox</b>	Del inglés "forkhead box"
<b>GCL</b>	Glutamato cisteína ligasa
<b>GCLc</b>	Glutamato cisteína ligasa, subunidad catalítica

<b>GCLm</b>	Glutamato cisteína ligasa, subunidad reguladora
<b>GLP-1</b>	Péptido similar al glucagón tipo 1
<b>GLP-1R</b>	Receptor de GLP-1
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>GSH</b>	Glutación
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad
<b>HO-1</b>	Hemoxigenasa-1
<b>KEAP1</b>	Del inglés “Kelch-like ECH-associated protein 1”
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos
<b>MEF</b>	Fibroblasto embrionario de ratón
<b>miARN</b>	Micro ARN
<b>mTOR</b>	Diana de rapamicina en mamíferos
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio
<b>NAD</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NRF2</b>	Factor nuclear derivado de eritrocitos 2
<b>p53</b>	Proteína supresora de tumores
<b>PAS</b>	Per-Arnt-Sim
<b>PASK</b>	Quinasa con dominios PAS
<b><i>Pask</i><sup>-/-</sup></b>	Ratones C57BL/6J deficientes en PASK
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de proliferación celular
<b>PDK-1</b>	Del inglés “Pancreatic and duodenal homeobox-1”
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	Coactivador 1 $\alpha$ del receptor activado por el proliferador de peroxisomas y
<b>PI3K</b>	Fosfatidil inositol 3 quinasa
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A

<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PPAR-<math>\alpha</math></b>	Receptor activado por el proliferador peroxisómico- $\alpha$
<b>PPAR-<math>\gamma</math></b>	Receptor activado por el proliferador peroxisómico- $\gamma$
<b>RIPA</b>	Del inglés “Radioimmunoprecipitation assay buffer”
<b>RNS</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>qRT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
<b>S6K1</b>	Quinasa de la proteína ribosomal S6
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SIRT</b>	Del inglés “Silent mating type information regulation 2 homolog”
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TBS</b>	Tampón Tris salino
<b>WT</b>	Tipo silvestre









## **INTRODUCCIÓN**

---

La PASK es una proteína quinasa con dominios PAS altamente conservada en la evolución, que detecta cambios de parámetros ambientales como el oxígeno, la luz, la glucosa, el ATP y el estado redox. De esta forma, PASK actúa de forma similar a otros sensores de nutrientes como la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR).

Además, PASK es un sensor regulador del equilibrio energético y metabólico, ya que se ha visto que ratones deficientes en PASK muestran una mejora en la tolerancia a la glucosa y están protegidos frente al desarrollo de obesidad, de esteatosis hepática y de resistencia a la acción de la insulina; tras ser alimentados con dietas ricas en grasa. Por tanto, PASK podría ser una buena diana terapéutica para el tratamiento de la diabetes y/o la obesidad.

El hígado es uno de los principales órganos encargados del mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en sangre, en respuesta al estado energético. Como consecuencia de su elevada actividad metabólica, genera una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), producidas principalmente en la mitocondria durante la fosforilación oxidativa. En condiciones fisiológicas, las especies reactivas de oxígeno actúan como moléculas reguladoras de la señalización celular para el mantenimiento de múltiples funciones fisiológicas, sin embargo, su exceso ocasiona estrés oxidativo. El hígado posee potentes sistemas de defensa como las enzimas antioxidantes, que eliminan el exceso de ROS. Sin embargo, un desequilibrio entre la producción de ROS y la respuesta antioxidante podría causar estrés oxidativo, como sucede durante el envejecimiento. Además, el proceso de envejecimiento se caracteriza metabólicamente por: el desarrollo de resistencia a la

insulina, cambios en la composición corporal y disfunción mitocondrial; resultando alterado el equilibrio homeostático.

Por otro lado, el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) es secretado por las células L intestinales tras la ingesta de alimentos. Su vida media en plasma es muy corta (1-2 minutos), ya que es degradado rápidamente por la proteasa dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4).

El GLP-1 presenta diversas funciones biológicas como la secreción postprandial de insulina y la regulación de la ingesta. Además, está implicado en el control de la generación de ROS y de la expresión de enzimas antioxidantes. De este modo, análogos del GLP-1 como la exendina-4 (más estable *in vivo*) son empleados en el tratamiento de la diabetes tipo 2 o la obesidad.

## **OBJETIVOS**

---

El principal objetivo de esta tesis ha sido analizar el papel de la PASK en el metabolismo oxidativo hepático, el estrés oxidativo y el envejecimiento; así como su mediación en las acciones del GLP-1 o su análogo, exendina-4, sobre el metabolismo oxidativo y la función mitocondrial.

## **RESULTADOS**

---

Nuestros estudios se han centrado en analizar los efectos de la deficiencia de PASK en el control del estado redox hepático. Para ello, inicialmente, estudiamos la expresión génica de *Pask* en hígado de ratón mediante qRT-PCR.

Después, analizamos el contenido hepático de ATP y ROS/RNS, revelando que estos niveles fueron menores en los ratones deficientes en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>), correlacionando con un menor número de mitocondrias en estos hepatocitos.

Además, los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> en situaciones de ayuno prolongado, mantenían activa la producción de ATP y ROS hepático, al contrario que los ratones silvestres. La respuesta adaptativa a períodos de ayunos prolongados requiere la activación de rutas de señalización intracelular cuya regulación es altamente compleja. Inicialmente, la respuesta ocurre a nivel transcripcional modulada por factores de transcripción y por coactivadores como el PGC-1 $\alpha$  (coactivador 1 $\alpha$  del receptor activado por el proliferador de peroxisomas  $\gamma$ ), el principal regulador de la biogénesis mitocondrial. Así, observamos que los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> presentaron mayor expresión hepática de *Pgc-1 $\alpha$* , *Nrf2*, *Ppar- $\gamma$* , *Ppar- $\alpha$*  y *Cox-IV*, implicados en la biogénesis y función mitocondrial, además de un elevado contenido de ADN mitocondrial.

Adicionalmente, la actividad post-transcripcional de PGC-1 $\alpha$  es regulada a su vez, mediante fosforilación y desacetilación por la AMPK y SIRT-1, respectivamente. Pues bien, los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> presentaron mayor expresión hepática de *Sirt-1*, junto con una localización subcelular alterada, ubicándose mayoritariamente en el núcleo.

Asimismo, la deficiencia de PASK estimulaba mecanismos hepáticos de supervivencia y protección celular frente al estrés oxidativo, aumentando la expresión de enzimas antioxidantes (SOD-Mn, SOD-Cu/Zn, CAT y GPx) y de factores de transcripción (NRF2, FoxO3a), y sobreactivando las vías Akt y ERK1/2.

Por otra parte, estudiamos la implicación de la PASK en las acciones reguladoras de la exendina-4 en el metabolismo oxidativo.

La exendina-4 impidió la expresión hepática del gen *Pask*. Además, el tratamiento con exendina-4 disminuyó la producción de ROS e indujo la expresión hepática de enzimas antioxidantes. La exendina-4 estimulaba la expresión hepática de *Pgc-1 $\alpha$* , *Nrf2*, *Ppar- $\gamma$*  y *Cox-IV*, implicados en la biogénesis y función mitocondrial, y los niveles proteicos de PCNA

y p53, involucrados en proliferación y muerte celular, respectivamente, siendo todos estos efectos dependientes de PASK. Sin embargo, los niveles plasmáticos de GLP-1, la expresión génica de su receptor (GLP-1R) en hígado y las acciones reguladoras de la exendina-4 disminuyeron durante el envejecimiento.

Por último, analizamos el papel de la deficiencia de PASK en el proceso de envejecimiento. En este sentido, demostramos que la expresión hepática del gen *Pask* disminuyó durante el envejecimiento. Además, los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> envejecidos (18-20 meses) no desarrollaron hiperglucemia e hiperinsulinemia, propias de la resistencia a la insulina generada durante el envejecimiento. Asimismo, los ratones deficientes en PASK mantuvieron bajos los niveles de ROS y mostraron menor disminución de la expresión de las enzimas antioxidantes durante el envejecimiento. También, conservaron funcionales los mecanismos hepáticos de supervivencia y reparación celular.

## CONCLUSIONES

---

Un control riguroso de los niveles de PASK es primordial para la regulación del estado redox en hígado, ya que su deficiencia aumenta: los sistemas de defensa antioxidante, la función y el contenido de ADN mitocondrial, y diversos mecanismos hepáticos de supervivencia y protección celular. Además, PASK participa en el desarrollo de las diversas alteraciones moleculares producidas durante el envejecimiento, dado que su deficiencia retarda o frena estas alteraciones. Por último, PASK es clave en la acción reguladora de la exendina-4, en relación con la respuesta antioxidante y la función mitocondrial, al menos en hígado.





## ***INTRODUCTION***

---

PASK is a protein kinase which contains PAS domains and is highly conserved along evolution. It is able to detect environmental changes like oxygen, light, glucose, ATP and redox state. In this way, PASK might behave like others nutrient sensors such as AMP-activated protein kinase (AMPK) and the mammalian target of rapamycin (mTOR).

Also, PASK is a regulator of cellular energy and metabolic balance, since it has been reported that PASK-deficient mice show a better glucose tolerance and they are resistant to development obesity, hepatic steatosis and insulin resistance; induced by a high-fat diet (HFD). Therefore, PASK could be a good therapeutic target for the treatment of the diabetes and/ or obesity.

The liver is one of the main regulator organ for the glucose homeostasis, in response to the cellular energetic state. As a result of its high metabolic activity, the liver generates a large amount of reactive oxygen species (ROS) produced mainly in the mitochondria during oxidative phosphorylation. Under physiological conditions, reactive oxidative species act as signal transducers in order to maintain multiple physiological functions. However, an exacerbated ROS production can trigger oxidative stress. The liver has powerful defence systems such as antioxidant enzymes against ROS excess. However, an imbalance between the production of ROS and the antioxidant response could cause oxidative stress, as occurs during aging. In addition, the aging process is characterized metabolically by: insulin resistance, changes in body composition and mitochondrial dysfunction; resulting in an altered homeostatic balance.



On the other hand, the glucagon-like peptide 1 (GLP-1) is secreted by L-intestinal cells after the nutrients intake. It has a very short half-life in plasma (1-2 minutes), due to a rapid degradation by the protease dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4).

GLP-1 has many biological functions such a postprandial insulin secretion and regulation of food intake. Additionally, it is involved in the production of ROS and the expression of antioxidant enzymes. Thereby, GLP-1 analogues such as exendin-4 (more stable *in vivo*) are used in the treatment of type 2 diabetes or obesity.

## **OBJECTIVES**

---

The main aim of this thesis has been to analyse the role of PASK in hepatic oxidative metabolism, oxidative stress and aging; as well as its mediating in the actions of GLP-1 or its analogue, exendin-4, on the oxidative metabolism and mitochondrial function.

## **RESULTS**

---

Our studies have focused on analysing the effects of PASK deficiency in the control of the hepatic redox state. For this purpose, initially, we studied the gene expression of *Pask* from mouse liver by qRT-PCR.

Then, we analysed the hepatic content of ATP and ROS/RNS, revealing that these levels were lower in PASK-deficient mice (*Pask*<sup>-/-</sup>), correlating with a lower number of mitochondria in these hepatocytes.

In addition, *Pask*<sup>-/-</sup> mice, under prolonged fasting situations, kept active the ATP and ROS production in the liver, oppositely to wild-type mice. Adaptive response to prolonged fasting periods requires the activation of intracellular signalling pathways whose regulation is highly complex. Initially, the response occurs at transcriptional level modulated by transcription factors and coactivators such as PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated

receptor gamma coactivator 1- $\alpha$ ), the main regulator of mitochondrial biogenesis. Thus, we observed that *Pask*<sup>-/-</sup> mice showed higher hepatic expression of *Pgc-1 $\alpha$* , *Nrf2*, *Ppar- $\gamma$* , *Ppar- $\alpha$*  and *Cox-IV*, involved in biogenesis and mitochondrial function, as well as, a higher content of mitochondrial DNA.

Additionally, post-transcriptional PGC-1 $\alpha$  activity is regulated by phosphorylation and deacetylation mediated by AMPK and SIRT-1, respectively. In this way, *Pask*<sup>-/-</sup> mice showed higher hepatic expression of *Sirt-1* and an altered sub-cellular distribution, mainly located in the nucleus.

Also, PASK deficiency stimulated hepatic mechanisms of cell survival and protection against oxidative stress, elevating the expression antioxidant enzymes (SOD-Mn, SOD-Cu/Zn, CAT, GPx) and transcription factors (NRF2, FoxO3a), and increasing the signalling through the Akt and ERK1/2 pathways.

On the other hand, we studied if PASK is involved in the regulatory actions of exendin-4 on the oxidative metabolism.

Exendin-4 blocked hepatic *Pask* gene expression. In addition, exendin-4 treatment decreased ROS levels and stimulated the expression of hepatic antioxidant enzymes. Exendin-4 increased the hepatic expression of *Pgc-1 $\alpha$* , *Nrf2*, *Ppar- $\gamma$*  and *Cox-IV*, involved in biogenesis and mitochondrial function, and PCNA and p53 protein levels, implicated in cell proliferation and death, respectively, being all these effects PASK dependent. However, the plasma levels of GLP-1, the gene expression of its receptor (GLP-1R) in the liver and the regulatory actions of exedin-4 decreased throughout aging.

Finally, we analysed the role of PASK deficiency in the aging process. In this sense, we showed that the hepatic *Pask* gene expression decreased during aging.

Also, aged *Pask*<sup>-/-</sup> mice (18-20 months) did not develop hyperglycaemia and hyperinsulinemia, induced by the insulin resistance developed during aging. Likewise, PASK-deficient mice kept low the levels of ROS and showed less decrease of expression of antioxidant enzymes during aging. As well, they conserved functional the hepatic cell survival and repair mechanisms.

## ***CONCLUSIONS***

---

The strict control of PASK levels is essential for the regulation of the redox-state in the liver, since its deficiency increases: antioxidant defence systems, the function and content of mitochondrial DNA, and several hepatic cell survival and protection mechanisms. In addition, PASK is involved in the development of several molecular alterations induced during aging, since its deficiency delays or reduces these alterations. Finally, PASK is key in the regulatory actions of exendin-4, in relation to the antioxidant response and mitochondrial function, at least in liver.





## 1. PAS QUINASA

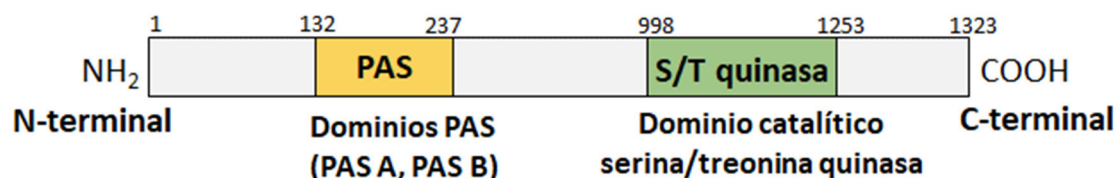
La PAS quinasa (PASK) denominada también PASKIN, es una proteína quinasa altamente conservada en la evolución, que detecta cambios de parámetros ambientales como el oxígeno, la luz, la glucosa, el ATP y el estado redox. De esta forma, la PASK actuaría de forma similar a otros sensores de nutrientes como la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) que responde a un incremento del cociente AMP/ATP intracelular, y la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR) que es activada por un incremento en la energía celular, estimulando el crecimiento celular y la síntesis de proteínas (Cardon and Rutter, 2012; Wenger et al., 2009).

Estudios recientes han indicado que la PASK actúa como un sensor de nutrientes en áreas hipotalámicas, pues responde a estados de ayuno/alimentación. Su deficiencia altera la respuesta de la AMPK y la vía mTOR en las regiones hipotalámicas implicadas en la regulación de la ingesta (Hurtado-Carneiro et al., 2014).

### 1.1. Estructura de la PAS quinasa

PASK contiene en su secuencia dos dominios Per-Arnt-Sim (PAS A, PAS B) N-terminales y un dominio catalítico serina/treonina quinasa en su extremo C-terminal (Amezcueta et al., 2002) (**Figura 1**).

Al igual que otros dominios PAS, los dominios PAS de la PASK adoptan unos pliegues donde se unen pequeñas moléculas orgánicas, dentro de su núcleo de hélices  $\alpha/\beta$  estructuralmente conservado e hidrofóbico. De este modo, permite que los dominios PAS sean capaces de detectar cambios ambientales y celulares (Zhang et al., 2015a). Sin embargo, el ligando fisiológico para esta quinasa sigue sin conocerse. Experimentos realizados *in vitro* indican que estos dominios tendrían una función inhibidora sobre la actividad quinasa (Cardon and Rutter, 2012).



**Figura 1. Esquema representativo de la estructura de PASK.**

El extremo N-terminal se ha indicado como “NH<sub>2</sub>” y el C-terminal como “COOH”. PASK contiene en su secuencia dos dominios Per-Arnt-Sim (PAS A, PAS B) N-terminales (*rectángulo amarillo*) y un dominio catalítico serina/treonina quinasa en el extremo C-terminal (*rectángulo verde*).

El extremo C-terminal de la PASK está constituido por un dominio serina/treonina quinasa, que regula la utilización de energía mediante fosforilación de sustratos como fosfodiesterasas, guanilato ciclasas, activadores transcripcionales, canales iónicos y proteínas quinasas (Zhang et al., 2015a).

Parece ser que PASK media sus efectos celulares fundamentalmente por su actividad quinasa, como se ha demostrado en levaduras (Cardon and Rutter, 2012). Además, la mayoría de las proteínas quinasas pasan de una conformación inactiva hacia una activa, a través de la fosforilación de los residuos de un bucle localizado en el interior del dominio quinasa denominado bucle de activación. La gran mayoría de proteínas ortólogas de PASK poseen un residuo de treonina fosforilable en este bucle (Cardon and Rutter, 2012).

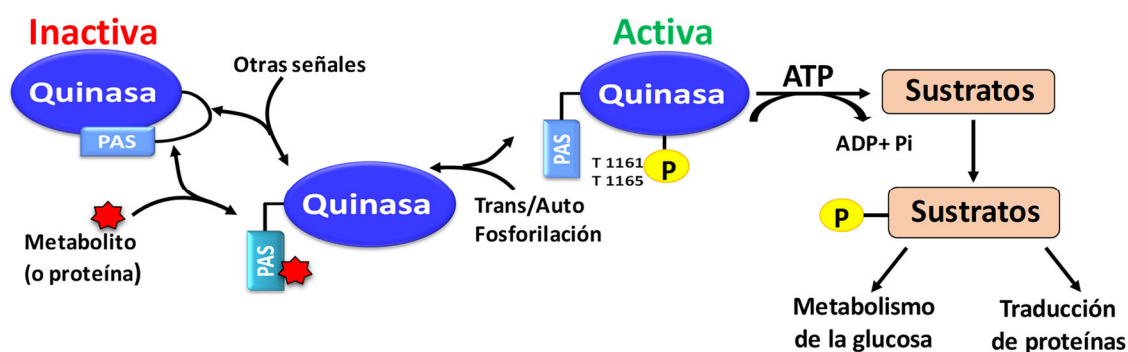
Por tanto, PASK podría desempeñar un papel fundamental en el control metabólico por medio de sus dos dominios y sus respectivas funciones.

## 1.2. Modelo de activación de la PAS quinasa

Se ha propuesto un modelo hipotético de activación de la PAS quinasa en levaduras, en el cual el dominio PAS se uniría al dominio quinasa, inhibiendo las funciones básicas de PASK. Esta inhibición podría ser interrumpida por la asociación de un pequeño metabolito o proteína con el dominio PAS, pudiendo alterar su conformación e interfiriendo en la unión

entre ambos dominios. De este modo, la actividad catalítica quedaría desbloqueada, y por tanto la proteína estaría funcionalmente activa (Hao and Rutter, 2008) (**Figura 2**).

Además, la mayoría de las proteínas quinasas requieren la fosforilación en residuos de serina/treonina o tirosina dentro del bucle de activación del dominio quinasa para completar su activación. Así, PASK posee un residuo de treonina que se autofosforila. Sin embargo, se ha demostrado que la fosforilación de este residuo no es prioritaria para la activación de PASK, ya que se han identificado cambios estructurales en el dominio quinasa de PASK, que estabilizan la conformación activa y su actividad catalítica en ausencia de fosforilación (Zhang et al., 2015a). De cualquier modo, se ha sugerido que la conservación evolutiva de este residuo de treonina podría ser importante para regular la actividad de esta quinasa (Kikani et al., 2010; Zhang et al., 2015a). La PASK es entonces susceptible de fosforilar diversos sustratos que regulan la utilización de energía. Sin embargo, el proceso por el cual PASK detecta los diferentes estados energéticos celulares es todavía desconocido, pero posiblemente esté relacionado con interacciones en los dominios PAS N-terminales.



**Figura 2. Modelo hipotético de la señalización dependiente de PASK en mamíferos.**

Tras la unión de un metabolito o proteína desconocida (*estrella roja*) a los dominios PAS, la PASK se autofosforilaría, activándose, y como consecuencia de ello incrementaría la fosforilación de determinados sustratos involucrados en el metabolismo de la glucosa y en la traducción de proteínas.

*Adaptado de Grose, J. H.; Rutter, J. 2010.*



### **1.3. Localización subcelular y expresión**

La proteína PAS quinasa se localiza predominantemente en el citoplasma de las células HeLa (Eckhardt et al., 2007), en levaduras (Huh et al., 2003) y en células N2A (Hurtado-Carneiro et al., 2014), pero también fue detectado en extractos nucleares de células HeLa (Eckhardt et al., 2007).

Estudios realizados en ratones determinaron que PASK se expresa en la mayoría de los tejidos, siendo su expresión en testículos, aproximadamente 100 veces mayor que en el resto (Katschinski et al., 2003).

### **1.4. Funciones y regulación de PAS quinasa en el metabolismo de mamíferos**

La PASK actúa como un sensor de nutrientes porque participa en la regulación de funciones metabólicas, según el estado nutricional celular.

La PASK se activa rápidamente (en 1 hora) por niveles elevados de glucosa en las células  $\beta$  pancreáticas de ratón. Esta activación está seguida por un incremento tanto del ARNm como de la proteína (al cabo de 24 horas), independientemente de la concentración de insulina (Zhang et al., 2015a).

#### **1.4.1. Papel de PAS quinasa en el metabolismo y control de la homeostasis de glucosa**

Se sabe que PASK es fisiológicamente un regulador fundamental en el metabolismo de la glucosa, en la síntesis del glucógeno por medio de la glucógeno sintasa (GS) y en el funcionamiento de las células de los islotes pancreáticos, regulando la secreción del glucagón y de la insulina (Wenger et al., 2009).

Las células  $\alpha$  pancreáticas son células endocrinas que, en respuesta a bajos niveles de glucosa en sangre, secretan glucagón, promoviendo la glucogenolisis y gluconeogénesis, regulando los niveles de glucosa en sangre. Pues bien, la PASK se expresa en estas células y

parece estar implicada en la secreción del glucagón, ya que estudios con células  $\alpha$  pancreáticas TC1-9 cultivadas *in vitro* con ARNip *Pask*, que silencia la expresión de *Pask*, mostraron un elevado nivel de secreción del glucagón (da Silva Xavier et al., 2011). Además, estudios *in vivo* con ratones deficientes en PASK, han demostrado que PASK inhibe la secreción del glucagón y disminuye los niveles de glucosa en sangre (da Silva Xavier et al., 2011).

Por otra parte, en los mamíferos las células  $\beta$  pancreáticas secretan insulina, cuando los niveles de glucosa aumentan, promoviendo la captación de glucosa por el tejido muscular y la glucogénesis, almacenando el exceso de glucosa en los depósitos de glucógeno en el hígado y músculo, permitiendo su rápida movilización en situaciones de ayuno. En este contexto, se ha propuesto que la PASK participa en la expresión y secreción de la insulina, inducida por glucosa. Así, estudios donde se bloqueó PASK en células de riñón HEK293T (Semplici et al., 2011) o células MIN6 (Fontes et al., 2009), indicaron que se reducía, tanto la actividad transcripcional del promotor del gen de la insulina, como la secreción de la misma. Esto podría indicar que PASK participa en la producción de la insulina, pudiendo estar directamente relacionada con la regulación de la expresión del factor de transcripción PDX-1 (*Pancreatic Duodenal Homeobox-1*), incrementando su estabilidad. PDX-1 es necesario para la transcripción del gen de la pre-proinsulina y primordial para el desarrollo del páncreas y la síntesis de insulina por las células  $\beta$  pancreáticas en mamíferos (Zhang et al., 2015a). Además, se ha demostrado que la glucosa regula la expresión del gen de la insulina, en parte, a través de la activación y la translocación de PDX-1, desde la periferia nuclear hacia el nucleoplasma, pudiendo estar relacionado este cambio de localización con la fosforilación de este factor de transcripción por PASK (Grose and Rutter, 2010). No obstante, existen controversias acerca de la relación que hay entre la fosforilación

de PDX-1 por PASK y la localización celular de PDX-1, pues otros estudios apuntan a que dicha fosforilación parece dirigir a PDX-1 fuera del núcleo (An et al., 2006).

También, determinados estudios indican que la PASK podría mediar el efecto de los ácidos grasos en la expresión del gen de la insulina, en respuesta a glucosa. De tal manera, que la sobreexpresión de PASK inducida por glucosa, aminoraría los efectos perjudiciales del palmitato en la expresión del gen de la pre-proinsulina y de PDX-1 (Fontes et al., 2009). Esto indicaría que la PASK es un mediador clave de los efectos de los ácidos grasos y de la glucosa en la expresión de la insulina en células  $\beta$  pancreáticas.

Además del papel regulador en la secreción de insulina y glucagón por el páncreas, PASK también es capaz de actuar a nivel de otros tejidos periféricos, regulando la homeostasis de la glucosa. Así, se ha descrito que los ratones deficientes en PASK muestran una mejora en la tolerancia a la glucosa (Hao et al., 2007), mientras que su desarrollo embrionario, crecimiento y reproducción son normales (Katschinski et al., 2003).

Por tanto, todos estos datos sugirieron que PASK podría ser utilizada como una posible diana para el tratamiento de enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2 (da Silva Xavier et al., 2011).

### *1.4.2. Papel de PAS quinasa en el metabolismo lipídico*

Una de las principales funciones de los lípidos es el almacenamiento energético, en forma de triglicéridos. Éstos actúan como el principal depósito de combustible metabólico, siendo movilizados en función de las necesidades metabólicas. En este sentido, el hígado es el órgano encargado de convertir el exceso de azúcares de la dieta en triglicéridos para su almacenamiento. En este contexto, se ha propuesto que PASK participa en la regulación de la actividad de enzimas que participan en el metabolismo lipídico (Hao et al., 2007). Es importante tener en cuenta, que estas acciones de PASK son específicas de tejido. Así, se

ha observado que la estimulación de PASK en el hígado incrementa la síntesis y el almacenamiento de triglicéridos, en cambio, en el músculo esquelético disminuye la oxidación de los ácidos grasos (Hao et al., 2007).

Se ha demostrado que los ratones deficientes en PASK alimentados con dietas ricas en grasa, estaban protegidos frente al desarrollo de obesidad, de esteatosis hepática, de resistencia a la acción de la insulina, desencadenada por las dietas ricas en grasa (Hao et al., 2007). Además, presentaban una respuesta alterada en la señalización de AMPK y mTOR/S6K1, bajo estados de ayuno y alimentación, respectivamente, tanto en el hígado como en las áreas hipotalámicas implicadas en el control de la ingesta (Hurtado-Carneiro et al., 2014).

Una de las principales consecuencias del desbalance en el metabolismo lipídico, como sucede por ejemplo con la ingesta de dietas ricas en grasa, es el exceso de acumulación de lípidos en el hígado. Ello conduce al desarrollo de enfermedades metabólicas como diabetes, obesidad e infiltración adiposa hepática. Por ello, es muy importante el mantenimiento del balance entre la síntesis de lípidos y el catabolismo (Zhang et al., 2015a) y en este sentido, como se ha mencionado, PASK tiene un papel fundamental.

#### 1.4.3. Papel de PAS quinasa en el metabolismo oxidativo

El metabolismo oxidativo o aerobio es el mecanismo por el cual a partir de moléculas orgánicas como la glucosa se genera energía (ATP), consumiendo oxígeno y produciendo CO<sub>2</sub>.

Se ha descrito que la delección de PASK conduce a un fenotipo hipermetabólico en músculo esquelético, donde la producción de ATP es mayor. Parece ser que el incremento del metabolismo oxidativo no es debido ni a un incremento en la masa mitocondrial, ni a cambios en la expresión de PGC-1 $\alpha$  (coactivador 1 $\alpha$  del receptor activado por el proliferador

de peroxisomas y), el principal regulador de la biogénesis mitocondrial. Asimismo, la deficiencia de PASK conlleva un incremento del gasto energético y metabólico en el músculo, incrementando el consumo de  $O_2$  y la liberación de  $CO_2$  (Hao et al., 2007). Estudios realizados en mioblastos deficientes en PASK mostraron una mayor oxidación de la glucosa y del palmitato, y un aumento de los niveles de ATP celulares (Hao et al., 2007). Además, estudios en células de neuroblastoma de ratón (N2A) donde la expresión de PASK fue bloqueada, presentaron un elevado contenido de ATP, a bajas concentraciones de glucosa (Hurtado-Carneiro et al., 2014). Pero, el mecanismo por el cual el metabolismo oxidativo es mayor en los ratones deficientes en PASK no está todavía claro, aunque la principal causa podría deberse a alteraciones producidas en la mitocondria (Hao et al., 2007).

Por tanto, PASK actúa como un sensor de nutrientes y regulador del equilibrio energético y metabólico, pudiendo ser una buena diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades que presenten alteraciones metabólicas como la diabetes o la obesidad.

## **2. HISTOFISIOLOGÍA DEL HÍGADO**

El hígado es un órgano compacto donde el parénquima está dividido en unidades estructurales denominadas lobulillos hepáticos, constituidos por millones de hepatocitos, que están delimitados por un estroma de tejido conectivo (Dorland, 2012).

El hígado está conectado a dos grandes vasos sanguíneos: la vena porta y la arteria hepática, que aportan sangre rica en nutrientes y oxígeno, respectivamente. La sangre proveniente de ambos vasos penetra por las áreas portales ubicadas en la periferia de los lobulillos hepáticos, mezclándose en los sinusoides hepáticos, y discurriendo hacia el centro del lobulillo hasta la vena centrolobulillar. En ese recorrido, los hepatocitos toman de la sangre los sustratos necesarios para sus funciones, ya sean metabólicas, de

almacenamiento o de detoxificación. Además de los hepatocitos, hay tres tipos celulares más: las células de Kupffer, células de Ito y células endoteliales (Bernabé Salazar A, 2015).

## 2.1. Funciones hepáticas

El hígado desempeña múltiples funciones como el almacenamiento de moléculas como el glucógeno o algunas vitaminas; la secreción de la bilis, la síntesis de enzimas, de glucosa y de proteínas plasmáticas; y la biotransformación de drogas y toxinas (Piñeiro-Carrero and Piñeiro, 2004).

### 2.1.1. Funciones metabólicas del hígado

Uno de los principales papeles del hígado es la función metabólica dirigida hacia el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, en respuesta a situaciones de ayuno y alimentación (Kapoor, 2015).

METABOLISMO	SITUACIÓN FISIOLÓGICA	
	AYUNO	ALIMENTACIÓN
<b>CARBOHIDRATOS</b>	Movilización y fragmentación del glucógeno a la sangre (Glucogenolisis)  Síntesis y liberación de glucosa a la sangre a partir de aminoácidos, lactato (Gluconeogénesis)	Síntesis y almacenamiento del glucógeno (Glucogenogénesis)  Controla los niveles de glucosa en sangre
<b>LÍPIDOS</b>	Oxidación de ácidos grasos para cubrir las necesidades energéticas ( $\beta$ -oxidación)	Síntesis de ácidos grasos y triglicéridos a partir de carbohidratos y proteínas (Lipogénesis)  Producción de fosfolípidos y colesterol para la formación de las membranas celulares y la síntesis de las sales biliares  Síntesis de lipoproteínas, necesarias para el transporte de ácidos grasos y colesterol (HDL, VLDL) en la sangre
<b>PROTEÍNAS</b>		Síntesis de proteínas plasmáticas como la albúmina, y factores de coagulación como el fibrinógeno  Síntesis de enzimas fundamentales de la transaminación, como la aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa

**Tabla 1. Principales funciones metabólicas del hígado frente a situaciones fisiológicas de ayuno y alimentación.**

Las principales funciones metabólicas del hígado, según la situación fisiológica, se encuentran resumidas en la **Tabla 1**.

### 2.1.2. El Hígado: un potente desintoxicante

El hígado es el principal órgano implicado en la desintoxicación de sustancias dañinas para el organismo. En la mayoría de los casos, los hepatocitos metabolizan las moléculas a compuestos solubles en agua para ser excretados. Sin embargo, en ciertas ocasiones las moléculas extrañas denominadas xenobióticos, se transforman a compuestos intermediarios tóxicos, convirtiéndose el hígado en un importante blanco para esa toxicidad (Piñeiro-Carrero and Piñeiro, 2004).

Algunas de las moléculas metabolizadas por el hígado se recogen en la **Tabla 2**.

Molécula metabolizada	Acción hepática
Bilirrubina	Es un producto que proviene de la degradación de la hemoglobina, siendo eliminada por el hígado a través de la bilis
Fármacos	Son metabolizados por enzimas hepáticas que oxidan, reducen o hidrolizan, facilitando que sea finalmente excretado por vía renal (en la orina) o hepática (en la bilis)
Amonio	Detoxificación a través del ciclo de la urea para su eliminación por la orina
Etanol	Se metaboliza a través de la enzima alcohol-deshidrogenasa. Dicha enzima está presente en el hígado y en otros tejidos
Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS)	Son neutralizadas mediante diversos sistemas de defensa que posee el hígado

**Tabla 2. Algunas moléculas metabolizadas por el hígado.**

#### *2.1.2.1 Neutralización del exceso de radicales libres por el hígado*

Los seres vivos, como consecuencia de su metabolismo aeróbico, generan una población heterogénea de subproductos biológicamente activos denominados radicales libres, que incluyen a las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS). Sin embargo, éstas pueden generarse de manera descontrolada produciendo daño celular y tisular.

El hígado es el principal órgano protector frente a los radicales libres, ya que posee múltiples sistemas de defensa como las enzimas antioxidantes, que descomponen las especies reactivas a moléculas inocuas. Los radicales libres no se distribuyen homogéneamente en el hígado, pues en el interior de los lobulillos hepáticos existe un gradiente decreciente de nutrientes y oxígeno, y por tanto una diferenciación zonal en cuanto a la actividad mitocondrial (Kietzmann, 2017).

Por ello, la función hepática es fundamental para el control en la producción y neutralización de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Mari et al., 2010).

### **3. LA MITOCONDRIA Y SU PAPEL EN LA GENERACIÓN Y EL CONTROL DE LOS RADICALES LIBRES**

La mitocondria es un orgánulo citoplasmático presente en mayor o menor cantidad, en casi todas las células de todos los organismos eucariotas (Karnkowska et al., 2016).

#### **3.1. Morfología y Estructura**

En el interior celular, las mitocondrias forman una red tubular que constantemente cambia por fenómenos de fusión y fisión (Lackner, 2014), por lo que es difícil describir una morfología concreta. Su tamaño oscila aproximadamente entre 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  de diámetro y hasta 7,0  $\mu\text{m}$  de longitud (Devlin, 2004).

Su número varía según el organismo, el tejido y el tipo celular, dependiendo de las necesidades energéticas de la célula. Así, los glóbulos rojos carecen de mitocondrias, mientras que los hepatocitos pueden llegar a tener más de 2.000 por célula (Voet et al., 2006).

Las mitocondrias contienen un ADN específico (ADNmt) portador de toda la información genética que codifica al ARN ribosómico, ARN de transferencia y proteínas que participan en la fosforilación oxidativa (Voet et al., 2006).



En cuanto a su estructura, las mitocondrias están rodeadas por dos membranas: la membrana externa y la membrana interna.

La membrana externa permite el paso de iones y pequeñas moléculas no cargadas, a través de proteínas de membrana que forman poros (porinas) como los canales aniónicos dependientes de voltaje. Sin embargo, las moléculas de tamaño más grande, especialmente las proteínas, tienen que ser importadas por medio de translocasas. En cambio, la membrana interna es una barrera que impide la difusión de iones y moléculas. Éstas sólo pueden cruzar con la ayuda de proteínas de transporte de membrana específicas para cada ion o molécula. Como resultado de la selectividad del paso de iones, se genera un potencial de membrana electroquímico que se acumula a través de la membrana mitocondrial interna. Además, en esta membrana tiene lugar la fosforilación oxidativa, fundamental en la síntesis del ATP (Kuhlbrandt, 2015).

Las membranas interna y externa de las mitocondrias definen tres compartimentos, cada uno con su función y sus correspondientes componentes proteicos. El compartimento más interno, rodeado por la membrana interna es la matriz mitocondrial, que contiene el ADNmt y los mitorribosomas. Además, en ella tiene lugar la replicación y la transcripción del ADNmt, la biosíntesis de proteínas mitocondriales y numerosas reacciones enzimáticas. El segundo compartimento es el espacio localizado entre la membrana externa y la interna, denominado espacio intermembranoso. La membrana mitocondrial interna contiene un gran número de proteínas que transportan iones, ATP, ADP y pequeños metabolitos, entre el citoplasma y la matriz mitocondrial. Asimismo, ésta forma invaginaciones denominadas crestas mitocondriales, que se extienden profundamente en la matriz. Las membranas de las crestas contienen la mayor parte de los complejos de la cadena de transporte de electrones y a la ATP sintasa. Además, las crestas definen al tercer compartimento

mitocondrial, el lumen de la cresta, que contiene grandes cantidades de la proteína transportadora de electrones, el citocromo C (Kuhlbrandt, 2015) (**Figura 3**).

### **3.2. Funciones mitocondriales**

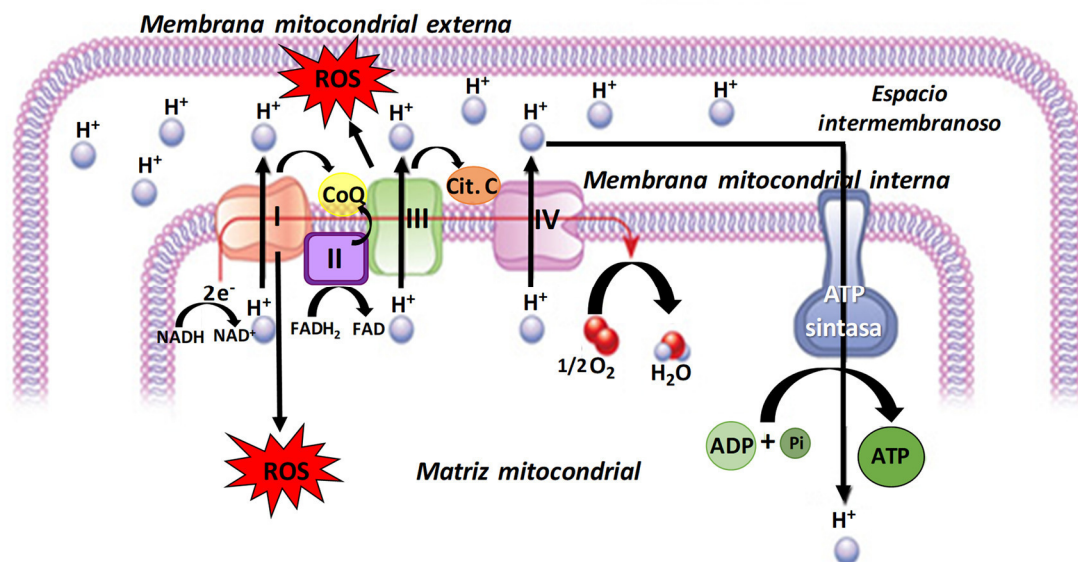
Las mitocondrias son orgánulos que tienen un papel fundamental en diversos procesos celulares como la producción de energía en forma de ATP, por medio de la fosforilación oxidativa; participan en la biosíntesis de biomoléculas como nucleótidos, urea, grupos hemo y algunos lípidos; la señalización de procesos biológicos como la muerte celular programada y el envejecimiento; la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y la detección de oxígeno (Vakifahmetoglu-Norberg et al., 2017). Además, las mitocondrias son las principales productoras de especies reactivas de oxígeno durante los procesos oxidativos del metabolismo, principalmente a través de reacciones óxido-reducción que ocurren en los complejos de la cadena respiratoria y cuyo aceptor final de electrones es el oxígeno (Bratic and Larsson, 2013).

### **3.3. Metabolismo mitocondrial**

#### **3.3.1. Transporte electrónico y fosforilación oxidativa mitocondrial**

Los nutrientes como los hidratos de carbono o los lípidos son oxidados, proporcionando a las células energía libre para la síntesis de ATP. Para ello, se transfieren electrones desde los nutrientes hasta el  $\text{O}_2$ , liberando energía que se almacena como gradiente de  $\text{H}^+$  en la membrana interna de la mitocondria que, a su vez, proporciona la energía necesaria para la síntesis de ATP. La transferencia de electrones tiene lugar mediante una cascada de reacciones de óxido-reducción, a través de una serie de transportadores que constituyen la cadena de transporte electrónico (ETC) o cadena respiratoria (Vakifahmetoglu-Norberg et al., 2017). La cadena de transporte electrónico se localiza en la membrana mitocondrial interna, concretamente en las crestas mitocondriales,

y está constituida por cuatro complejos proteicos (I, II, III, IV) y dos factores solubles (citocromo C y coenzima Q) (**Figura 3**).



**Figura 3. Representación esquemática del transporte electrónico y la fosforilación oxidativa mitocondrial.**

Las membranas mitocondriales interna y externa se representan como bicapas lipídicas, entre ellas se encuentra el espacio intermembranoso, y en el compartimento más interno la matriz mitocondrial. La transferencia de electrones tiene lugar mediante una cascada de reacciones de óxido-reducción, a través de una serie de transportadores que constituyen la cadena de transporte electrónico (ETC). Ésta se constituye por 4 complejos proteicos (I, II, III, IV) (*rectángulos de color naranja, morado, verde y rosa, respectivamente*), localizados en la membrana mitocondrial interna, y por dos factores solubles: la coenzima Q y el citocromo C (*círculos de color amarillo y naranja, respectivamente*). A medida que los electrones (e<sup>-</sup>) pasan a lo largo de ellos, se transportan protones (H<sup>+</sup>) desde la matriz al espacio intermembranoso. Al final de la cadena de transporte de electrones, dos electrones (2e<sup>-</sup>) se utilizan para la conversión de 1/2 de O<sub>2</sub> en agua (H<sub>2</sub>O). La transferencia de electrones a lo largo de la ETC conduce a la formación de las especies reactivas de oxígeno (ROS). La acumulación de protones transportados al espacio intermembranoso provoca un gradiente utilizado por la ATP sintasa para producir ATP.

Generalmente, la cadena respiratoria mitocondrial ha sido descrita, según el “*modelo clásico o fluido*”, donde los cuatros complejos multiproteicos (del I al IV) están embebidos en la membrana mitocondrial interna y se desplazan de forma independiente, estando conectados por los transportadores móviles de electrones (citocromo C y CoQ). Pero, este fenómeno tiene la desventaja de que no es capaz de identificar si los electrones que llegan han sido introducidos en la cadena de transporte electrónico desde el NADH

(complejo I) o desde el  $\text{FADH}_2$  (complejo II). Actualmente, existe un modelo alternativo “*modelo sólido*”, donde los complejos multiproteicos se ensamblan en estructuras más grandes denominadas supercomplejos respiratorios o respirosomas, cuya finalidad es la realización de un transporte más rápido y eficiente de los electrones (Acin-Perez et al., 2008).

De cualquier forma, está descrito que los complejos I y II median la transferencia de dos electrones, a partir de los donadores de electrones: NADH y  $\text{FADH}_2$ , respectivamente, a la coenzima Q. También, pueden recibir electrones provenientes de la oxidación de nutrientes como ácidos grasos, aminoácidos y colina. El complejo III es un adaptador que recibe los electrones de la coenzima Q reducida y los transporta al citocromo C. El complejo IV termina la cadena respiratoria captando los electrones del citocromo C para reducir completamente el oxígeno hacia agua (Reichert and Neupert, 2004) (**Figura 3**).

Las reacciones de óxido-reducción (redox) de la ETC causan una serie de cambios conformacionales en los complejos respiratorios que les permite bombear protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranoso, generando un gradiente electroquímico de protones denominado potencial de transmembrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ). El gradiente de protones producido por los complejos I, III y IV crea una fuerza protón-motriz. La energía liberada al disiparse el gradiente es aprovechada por la ATP sintasa para fosforilar ADP y producir ATP (Reichert and Neupert, 2004) (**Figura 3**).

El gradiente de protones generado durante el transporte electrónico es utilizado con múltiples finalidades (Wallace et al., 2010):

- ❖ Generación de calor.
- ❖ Síntesis de ATP en la matriz mitocondrial a partir de  $\text{ADP} + \text{P}_i$ .
- ❖ Regulación de la muerte celular programada (apoptosis).

- ❖ Importación del  $\text{Ca}^{2+}$  y proteínas mitocondriales, a través de la membrana mitocondrial interna (Neupert and Herrmann, 2007).

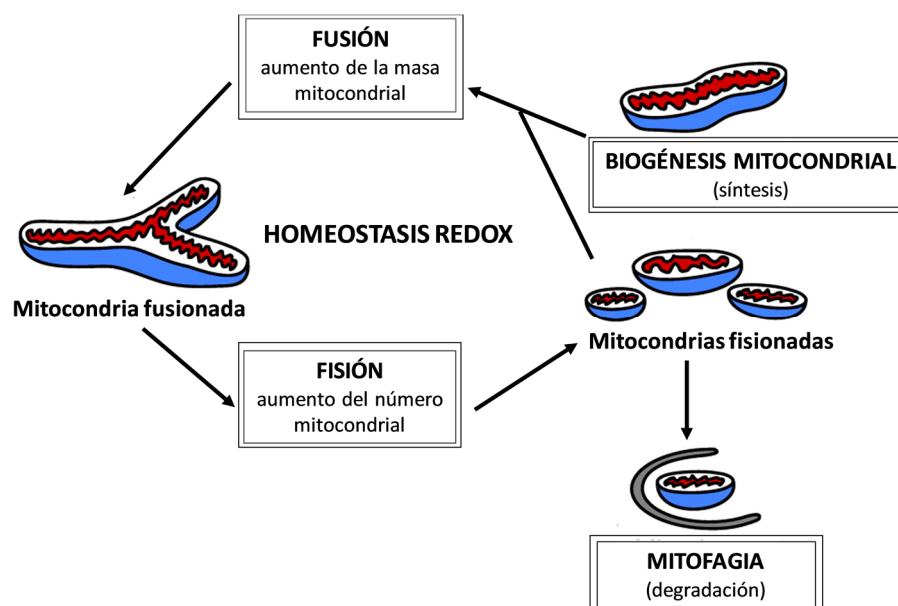
En conclusión, la mitocondria es el principal productor de energía aerobia, a través de reacciones de óxido-reducción que suceden en los complejos de transferencia de electrones para la síntesis de ATP. Además, la transferencia de electrones a lo largo de la cadena respiratoria mitocondrial ocasiona la producción de radicales libres, que dañan las estructuras celulares propiciando el desarrollo de enfermedades.

### **3.4. Regulación de la calidad y la función mitocondrial: dinámica mitocondrial**

El mantenimiento de la calidad mitocondrial es esencial para la función celular especialmente en hígado, un órgano con una demanda energética elevada (Youle and van der Bliek, 2012).

La dinámica mitocondrial está basada en los fenómenos de fusión y fisión, y juega un papel clave en el mantenimiento de mitocondrias viables, así como en la regulación del metabolismo y la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  (Gottlieb and Gustafsson, 2011) (**Figura 4**). Este proceso se regula atendiendo al estado metabólico celular, de este modo el ayuno está relacionado con la fisión mitocondrial (Sebastian et al., 2017).

Se ha visto que alteraciones en las proteínas involucradas en la dinámica mitocondrial como las mitofusionas (Mfn1, Mfn2) están asociadas con la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la acción de la insulina, inducidas en la obesidad, la diabetes tipo 2 o el envejecimiento (Sahin and DePinho, 2012; Sebastian et al., 2012).

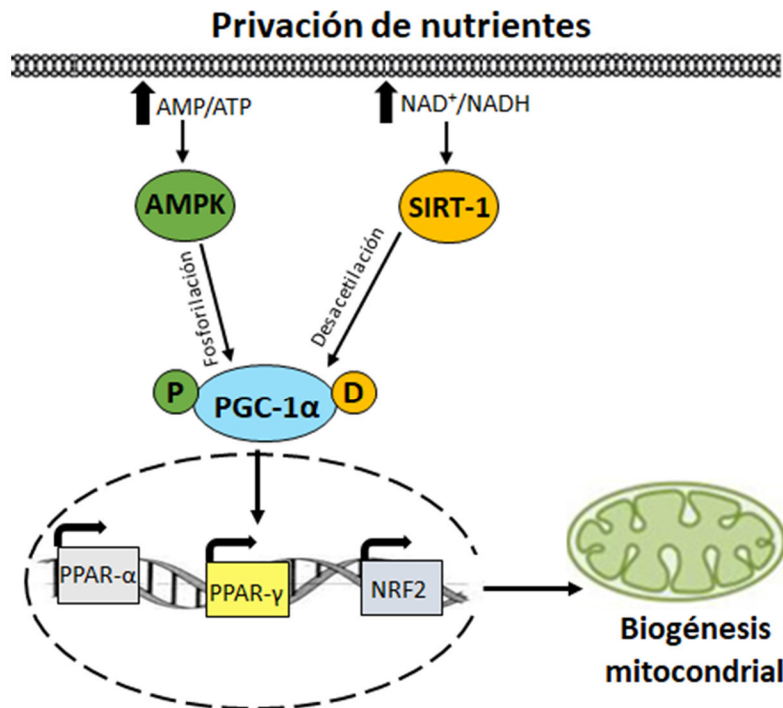


**Figura 4. Esquema resumen de los distintos mecanismos de regulación del control y calidad mitocondrial: Fusión y Fisión (Dinámica mitocondrial), Biogénesis mitocondrial y Mitofagia.**

Así, la deficiencia de la proteína Mfn2 en músculo de ratones obesos y diabéticos tipo 2, ocasiona alteraciones en la síntesis de ATP, una producción descontrolada de ROS y disfunción mitocondrial (Bach et al., 2003; Mourier et al., 2015).

Fundamentalmente, el mantenimiento de la calidad de la función mitocondrial se basa en la producción de nuevas mitocondrias (biogénesis mitocondrial) y en la eliminación de mitocondrias no funcionales (mitofagia) (Palikaras et al., 2015) (**Figura 4**).

El coactivador PGC-1 $\alpha$  es el principal regulador de la biogénesis mitocondrial, además de controlar las propiedades y la función mitocondrial. Éste activa la expresión de diversos factores de transcripción como los PPARs (Receptores activados por el proliferador peroxisómico) y NRF2 (Factor nuclear derivado de eritrocitos 2), ya que su interacción facilita la actividad de las histonas acetiltransferasas y el ensamblaje de la maquinaria transcripcional en los genes diana (Austin and St-Pierre, 2012) (**Figura 5**).



**Figura 5. Señalización del coactivador PGC-1α en biogénesis mitocondrial.**

La biogénesis mitocondrial es regulada por la proteína AMPK y la desacetilasa SIRT-1, pues mediante la fosforilación y desacetilación, respectivamente, promueven la activación transcripcional de PGC-1α. De este modo, el coactivador PGC-1α activa la expresión de diferentes factores de transcripción como PPAR-γ, PPAR-α y NRF2, implicados en la función y la biogénesis mitocondrial.

Aparte de PGC-1α, la biogénesis mitocondrial, también, es controlada por la proteína AMPK y la desacetilasa SIRT-1, ya que mediante la fosforilación y desacetilación, respectivamente, promueven la activación transcripcional de PGC-1α (Canto and Auwerx, 2009) (**Figura 5**). Se ha visto que ratones envejecidos deficientes en PGC-1α (*Pgc-1α*<sup>-/-</sup>) muestran reducida la fosforilación oxidativa mitocondrial en músculo esquelético, relacionándose con el desarrollo de resistencia a la insulina (Lin et al., 2004).

#### 4. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

El oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) es uno de los gases más importantes de la Tierra, constituyendo el 21 % de la atmósfera (Macedo-Márquez, 2012), donde los seres vivos

aerobios lo utilizan para respirar y obtener energía. Sin embargo, como consecuencia de la reducción incompleta del oxígeno, se pueden producir moléculas muy reactivas denominadas especies reactivas de oxígeno.

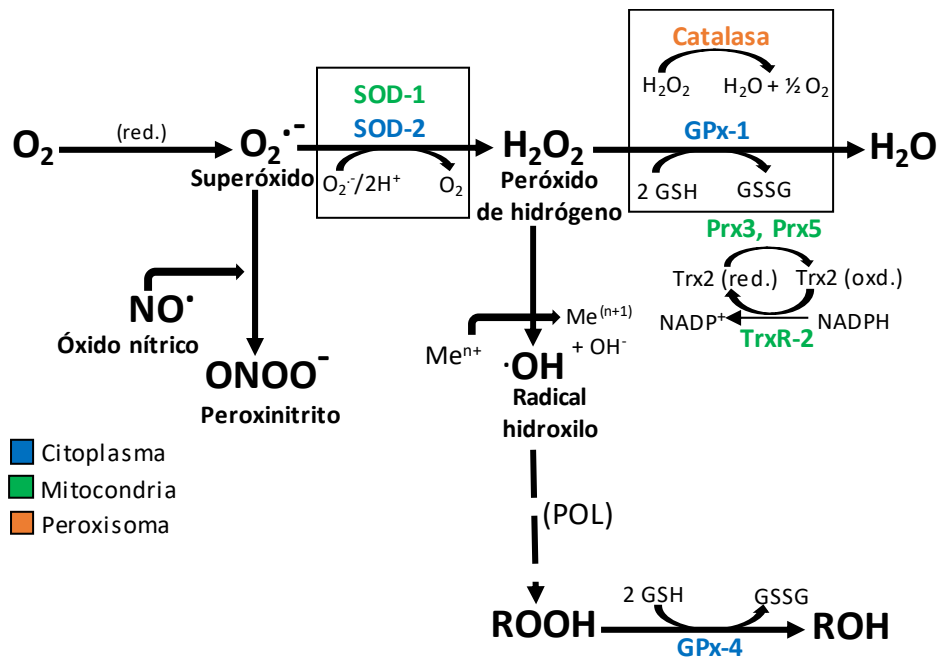
#### **4.1. Generación de ROS mitocondrial**

En condiciones fisiológicas normales, la producción de ROS está altamente regulada por el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Sin embargo, cuando el transporte electrónico es inhibido por una mutación en algún gen del sistema de fosforilación oxidativa o reducido por la ingesta excesiva de nutrientes, los donadores de electrones de la ETC acumulan electrones en exceso que se dirigen directamente al oxígeno ( $O_2$ ) generándose el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (**Figura 6**).

El anión superóxido por sí mismo es relativamente atóxico, sin embargo, al tener  $1e^-$  desapareado, se combina fácilmente con otro radical libre, el óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), dando lugar al peroxinitrito ( $OONO^{\cdot}$ ), el cual se considera también una especie reactiva de oxígeno (**Figura 6**). El peroxinitrito es capaz de producir peroxidación lipídica y daño en las proteínas de membrana por nitración de grupos OH de Tyr de las mismas (Wallace et al., 2010).

Además, el anión superóxido producido por el complejo I es liberado a la matriz mitocondrial, donde se convierte en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por la enzima mitocondrial SOD-Mn (Wallace et al., 2010). Hay que destacar que el complejo II no es una bomba de protones y que su función principal es participar en el transporte de electrones, a través de  $FADH_2$ . Igualmente, el complejo III de la ETC también genera anión superóxido que es liberado al espacio intermembranoso mitocondrial, donde se transforma en peróxido de hidrógeno por la enzima citosólica superóxido dismutasa cobre/zinc (SOD-Cu/Zn o SOD-1) (Wallace et al., 2010) (**Figura 6**).





**Figura 6. Esquema de la formación de los distintos tipos de especies reactivas de oxígeno y las enzimas antioxidantes involucradas en su eliminación.**

Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), glutatión reducido (GSH), glutatión disulfuro (GSSG), superóxido dismutasa cobre/zinc (SOD-1), superóxido dismutasa manganeso (SOD-2), glutatión peroxidasa-1 (GPx-1), glutatión peroxidasa-4 (GPx-4), tiorredoxina-2 (Trx2), peroxirredoxina-3 (Prx3), peroxirredoxina-5 (Prx5), oxidación (oxd.), reducción (red.), peroxidación lipídica (POL). Los distintos colores indican la localización subcelular de cada una de las enzimas antioxidantes.

El peróxido de hidrógeno es estable y menos reactivo que el anión superóxido. Sin embargo, en presencia de metales reducidos como el  $Fe^{2+}$ , que puede estar en forma libre o formando complejos con proteínas puede producirse el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). Este oxidante es muy reactivo y puede iniciar reacciones en cadena de radicales con una gran variedad de moléculas orgánicas, promoviendo la oxidación de los ácidos grasos, la peroxidación de lípidos, la inactivación de enzimas y el daño de los ácidos nucleicos (Brunet et al., 2004). Además, el peróxido de hidrógeno es capaz de disociarse a agua ( $H_2O$ ) y a oxígeno molecular, en una reacción catalizada por la enzima catalasa, localizada

fundamentalmente en el peroxisoma. Asimismo, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede reducirse a  $\text{H}_2\text{O}$ , a través de tres vías alternativas (Brunet et al., 2004) (**Figura 6**):

- ❖ La vía del glutatión, donde la reacción es catalizada por la enzima glutatión peroxidasa 1 (GPx-1).
- ❖ La vía de las peroxirredoxinas de tipo 3 (Prx3) y 5 (Prx5), donde actúa la proteína tiorredoxina (Trx) como sustrato.
- ❖ El sistema de las tiorredoxinas reductasas (TrxR) que convierte la tiorredoxina oxidada de nuevo a su forma reducida, siendo esta reacción dependiente de NADPH.

Antioxidante	Localización subcelular	Propiedad antioxidante	Reacción catalizada
ENZIMÁTICOS			
Superóxido dismutasa manganeso (SOD-Mn o SOD-2)	Mitocondria	Dismutar radicales superóxido	$\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
Superóxido dismutasa cobre-zinc (SOD-Cu/Zn o SOD-1)	Citosol	Dismutar radicales superóxido	$\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
Glutatión peroxidasa (GPx)	Citosol y mitocondria	Eliminar peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos	$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \longrightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$
Catalasa (CAT)	Peroxisoma y mitocondria	Eliminar peróxido de hidrógeno	$2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
Peroxiirredoxina (Prx)/ Tiorredoxina (Trx)	Mitocondria y citosol	Reducir hidroperóxidos como el peróxido de hidrógeno	$\begin{array}{c} \text{Trx (SH)}_2 \xrightleftharpoons{\text{Prx}} \text{TrxS}_2 \\ \text{NADP}^+ \xrightleftharpoons{\text{TrxR}} \text{NADPH} + \text{H}^+ \end{array}$
NO ENZIMÁTICOS			
Glutatión (GSH)	Citosol y mitocondria	Eliminar los radicales libres y peróxidos	-
Vitaminas E y C	Solubles en lípidos de membranas y citosol, respectivamente	Interrumpir la cadena de peroxidación lipídica, y neutralizar una gran variedad de ROS en fase acuosa	-
Ácido lipoico	Localizados tanto en la fase acuosa como en la lipídica	Reciclar la vitamina C y puede sustituir al GSH	-
Carotenoides	Membrana celular. Son solubles en lípidos	Reducir la peroxidación lipídica	-

**Tabla 3. Principales sistemas de defensa antioxidante presentes en los seres vivos.**

Superóxido dismutasa manganeso (SOD-Mn), superóxido dismutasa cobre-zinc (SOD-Cu/Zn), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), peroxirredoxina (Prx), tiorredoxina (Trx).

## **4.2. Sistemas de defensa antioxidante**

Los seres vivos poseen sistemas de eliminación de ROS (antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos) finamente regulados para mantener bajos los niveles, en un rango fisiológico normal, ya que son moléculas primordiales para algunos procesos celulares (**Tabla 3**).

## **4.3. Funciones de ROS como moléculas de señalización celular**

Las especies reactivas de oxígeno, a niveles bajos, actúan como moléculas reguladoras de la señalización celular para el mantenimiento de las funciones fisiológicas.

### **4.3.1. Acción y secreción de la insulina**

Algunos estudios de los años 70 aseguraban que unos niveles bajos de peróxido de hidrógeno celulares no eran suficientes para desencadenar la autofosforilación del receptor de la insulina en ausencia de insulina, pero se llegaba a mejorar la respuesta a la insulina. De este modo, en este caso, el peróxido de hidrógeno desempeñaba un papel fundamental en la homeostasis de la glucosa. En cambio, se ha visto que niveles desorbitados de ROS se encontraban asociados a la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas en la diabetes tipo 1. Además, estudios realizados en ratones diabéticos mostraban elevada la expresión de una enzima productora de superóxido, llamada Nox1 (NADPH oxidasa 1), en las células de los islotes pancreáticos. Además, la inhibición de la Nox1 suprimía la secreción de la insulina. Esto sugirió que Nox1 era fundamental para la función normal de la célula  $\beta$  pancreática (Uchizono et al., 2006).

Asimismo, se ha visto que el ejercicio y la contracción muscular inducen un incremento en el transporte de la glucosa hacia el músculo, estimulando el reclutamiento del transportador de la glucosa GLUT-4, a la membrana plasmática, por un mecanismo diferente al activado por la insulina y siendo mediado por la proteína AMPK. De este modo,

el peróxido de hidrógeno activa a la AMPK y aumenta la captación de la glucosa (Sandstrom et al., 2006).

#### 4.3.2. Regulación de transportadores y canales iónicos

Las especies reactivas de oxígeno actúan sobre la actividad de proteínas involucradas en el transporte, especialmente canales de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ . La exposición de células a  $H_2O_2$  induce un rápido incremento en la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  en varios tipos celulares (Bartosz, 2009).

#### 4.3.3. Adhesión y expansión celular

Las especies reactivas de oxígeno están involucradas en la interacción de integrinas con ligandos extracelulares (fibronectina o laminina). Además, induce la modificación de proteínas del citoesqueleto que intervienen en la polimerización de la actina y la contractibilidad, y por consiguiente en la expansión celular (Chiarugi, 2008).

#### 4.3.4. ROS como regulador del pH celular

El incremento del ratio  $H_2O_2/O_2^{\cdot-}$  conduce a la acidificación del citosol. El posible mecanismo de este efecto se ha ligado a la inhibición de los reguladores de pH dependientes de ATP (Bartosz, 2009).

#### 4.3.5. Proliferación celular

Diversos estudios han revelado que la exposición de las células a bajos niveles de ROS, estimula la división y la proliferación, mientras que cuando éstos suben se estimula la apoptosis y la necrosis (Toyokuni and Akatsuka, 2007).

Así, según el grado del daño del ADN, pueden activarse mecanismos de replicación y reparación celular, que como consecuencia, aumenta la expresión de la proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), esto posiblemente mediado por la proteína

supresora de tumores p53; o estimularse la vía de la apoptosis (Kelman, 1997). Además, varias proteínas reguladoras del ciclo celular como las ciclinas tienen motivos susceptibles a ROS (residuos de Cys y cofactores metálicos en proteínas quinasas y fosfatasa). Por eso, se ha especulado que la señalización de ROS podría jugar un papel importante en la progresión del ciclo celular, regulando el paso de las fases G0/G1 a S a G2 y M del ciclo celular (Menon and Goswami, 2007).

#### **4.4. Desregulación del sistema ROS/enzimas antioxidantes. Estrés Oxidativo**

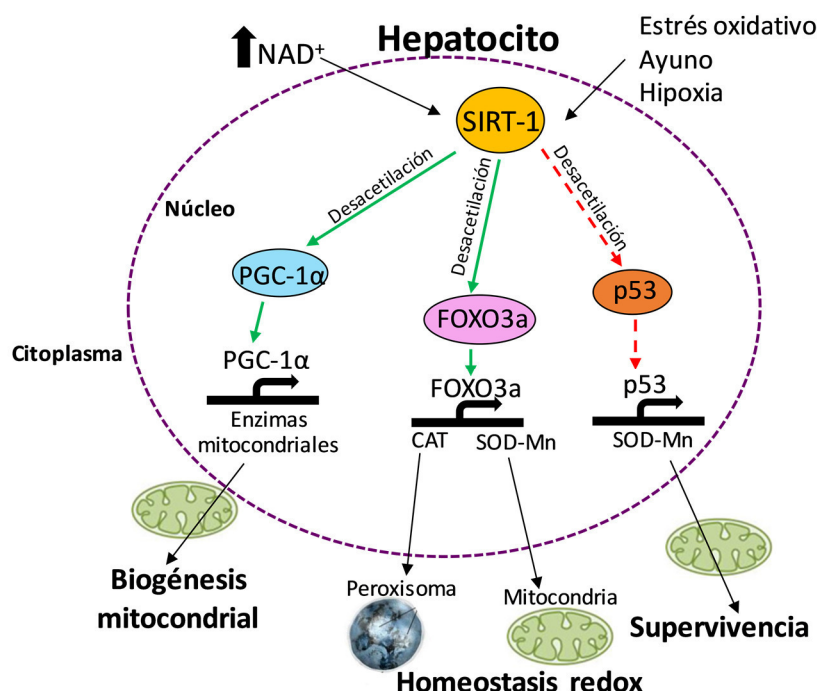
Los niveles de especies reactivas de oxígeno pueden verse alterados en determinadas circunstancias, como el aumento descontrolado de la oxidación de compuestos endógenos y exógenos, el agotamiento de los antioxidantes no enzimáticos y la inactivación o disminución en la producción de enzimas antioxidantes (**Tabla 3**). Esta situación ocasiona el fenómeno denominado estrés oxidativo, causado por el desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad de eliminarlas mediante mecanismos antioxidantes, conduciendo hacia el desarrollo del envejecimiento celular y a enfermedades como el Alzheimer y la Diabetes (Lushchak, 2014).

##### 4.4.1. Mecanismos de regulación frente al estrés oxidativo

###### *4.4.1.1. Regulación transcripcional*

Las especies reactivas de oxígeno pueden modular la expresión y la actividad de numerosos factores de transcripción como el coactivador PGC-1 $\alpha$ , FoxO, p53 y NRF2.

La familia de proteínas Fox (*Forkhead box*) está constituida por una serie de factores de transcripción (FoxA- FoxS) que incluye a las proteínas FoxO, que se encuentran implicadas en la respuesta al estrés oxidativo y la regulación de la longevidad.

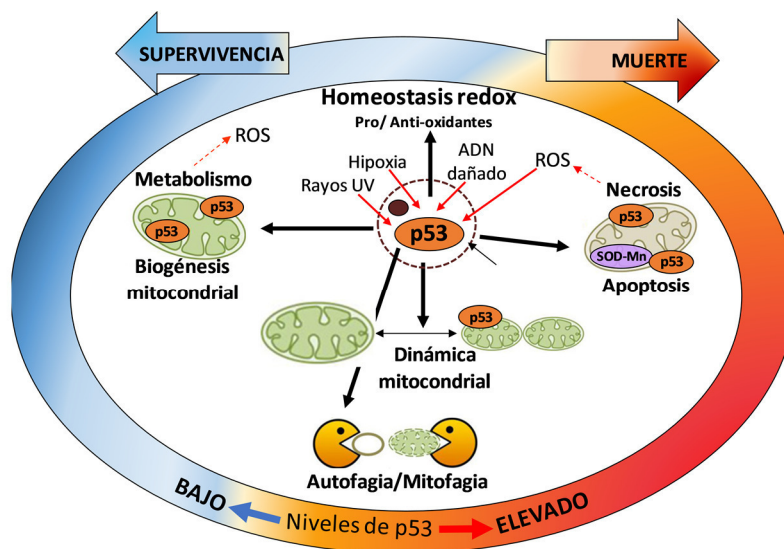


**Figura 7. Principales factores de transcripción activados bajo condiciones de ayuno, hipoxia y estrés oxidativo en hepatocitos.**

La sirtuina de tipo 1 (SIRT-1) (círculo amarillo) es una enzima desacetilasa dependiente de  $NAD^+$ , que es capaz de regular la actividad transcripcional del coactivador PGC-1 $\alpha$  (proliferador peroxisómico  $\gamma$ ) (círculo azul), el principal regulador de la función y la biogénesis mitocondrial. Además, la SIRT-1 desacetila a FoxO3a (*Forkhead box, subclase O*) (círculo rosa), favoreciendo su translocación nuclear y su actividad transcripcional, e induciendo la expresión génica de las enzimas antioxidantes la CAT y la SOD-Mn. Sin embargo, esta desacetilasa inhibe al supresor de tumores, p53 (círculo naranja), impidiendo que reprima la expresión de la enzima SOD-Mn y promoviendo la supervivencia celular.

En condiciones desfavorables, FoxO3a es desacetilado por la sirtuina de tipo 1 (SIRT-1), favoreciendo su translocación nuclear y su actividad transcripcional, fomentando la expresión de genes antioxidantes como la superóxido dismutasa manganeso y la catalasa (Tothova et al., 2007) (**Figura 7**). Estudios con ratones deficientes en FoxO3a (*FoxO3a*<sup>-/-</sup>) mostraron niveles elevados de ROS y una baja expresión de proteínas antioxidantes (Tothova et al., 2007). De este modo, FoxO3a funciona como un regulador negativo de los niveles celulares de ROS.

Por otra parte, la proteína supresora de tumores p53, también influye en la expresión de genes reguladores del estado redox celular, desempeñando un papel fundamental en la apoptosis y supervivencia celular. De este modo, el mecanismo de muerte celular producido, como consecuencia del estrés oxidativo, es dependiente de su severidad. Así, este factor de transcripción, en condiciones de bajo estrés oxidativo, presenta una localización citoplasmática, exhibiendo actividad antioxidante, ya que estimula la expresión de enzimas como la glutatión peroxidasa 1 (Liu et al., 2008).



**Figura 8. Mecanismos de acción del supresor de tumores p53, según el estado redox celular.**

p53 puede translocarse del citoplasma a la mitocondria, donde directamente puede interaccionar con la enzima SOD-Mn, inhibiéndola, o puede activar una serie de proteínas que regulan la función mitocondrial como la apoptosis, la mitofagia, la biogénesis mitocondrial y los fenómenos de fusión/fisión (dinámica mitocondrial), controlando el estado redox celular. Bajo situaciones que originan elevado estrés oxidativo, p53 puede desencadenar procesos proapoptóticos. Sin embargo, si la alteración oxidativa es muy intensa puede inducir la necrosis.

En cambio, una alteración moderada en la oxidación puede desencadenar la apoptosis mediada por p53, localizándose fundamentalmente en el núcleo, activando o reprimiendo genes proapoptóticos. Además, p53 puede translocarse del citoplasma a la

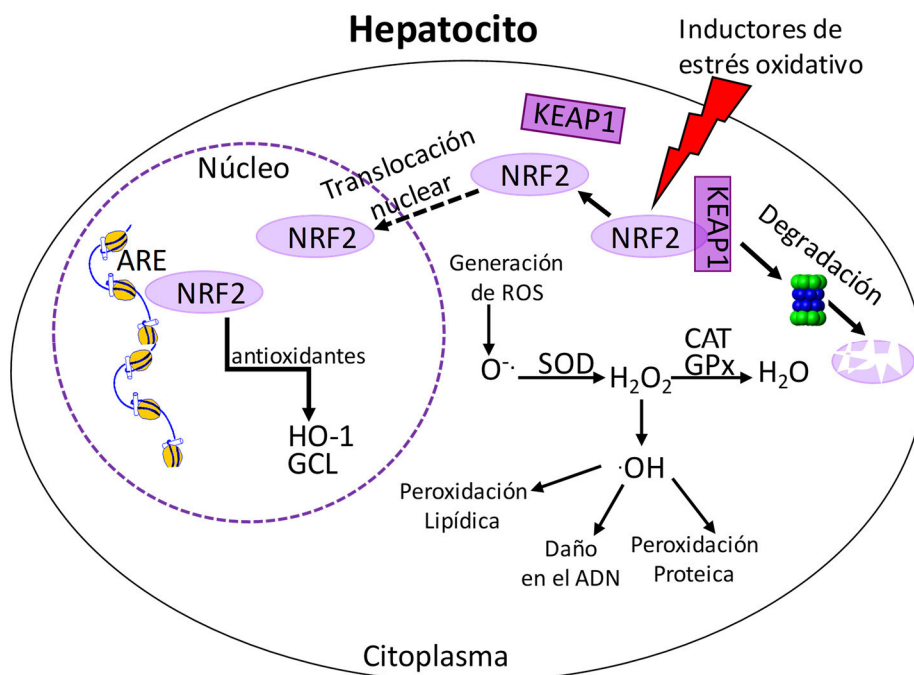
mitocondria, donde directamente puede interaccionar con la enzima antioxidante SOD-Mn, inhibiéndola, o puede activar una serie de proteínas que regulan la función mitocondrial como la apoptosis, la autofagia/mitofagia; la biogénesis mitocondrial y los fenómenos de fusión/fisión (Liu and Xu, 2011; Wang et al., 2014) **(Figuras 7 y 8)**. Sin embargo, si la alteración oxidativa es muy intensa puede provocarse la necrosis (Lennon et al., 1991) **(Figura 8)**. Pues bien, la transición que hay entre apoptosis y necrosis, bajo estrés oxidativo extremo, puede estar controlado por la activación de la caspasa-3 (Lee and Shacter, 2000).

El factor de transcripción NRF2 es uno de los más importantes reguladores de la defensa celular frente al estrés oxidativo, ya que regula la expresión de numerosos genes de enzimas antioxidantes, mediante su unión a una secuencia específica del ADN denominada ARE (Elemento de Respuesta Antioxidante) (Fainstein, 2007).

La actividad del NRF2, bajo condiciones normales, se encuentra constitutivamente inhibida por su unión al citoesqueleto, a través de la proteína citoplásmica KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), un sensor de estrés celular, conduciendo a NRF2 a la ubiquitinación y la degradación proteosomal (Oh and Jun, 2017) **(Figura 9)**. En cambio, tras una situación de estrés, NRF2 se disocia de KEAP1, se transloca al núcleo y activa la transcripción de los genes que codifican a las subunidades GCLc y GCLm (Glutamato cisteína ligasa subunidad catalítica y subunidad reguladora, respectivamente), responsables de la biosíntesis del glutatión (GSH), o la enzima HO-1 (Hemoxygenasa-1), que cataliza la oxidación del grupo hemo generando monóxido de carbono (CO) y biliverdina.

Por tanto, la regulación de su actividad radica fundamentalmente en su distribución subcelular y no en la síntesis de novo (Fainstein, 2007) **(Figura 9)**.





**Figura 9. Mecanismo de acción de la vía de señalización redox NRF2/KEAP1 en hepatocitos.**

La actividad del NRF2 (*círculo morado claro*) bajo condiciones redox normales, se encuentra constitutivamente inhibida por su unión a la proteína citoplasmática denominada KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) (*rectángulo morado oscuro*), conduciéndole hacia la ubiquitinación y la degradación proteosomal. En cambio, tras una situación de estrés, NRF2 se disocia de KEAP1, se transloca al núcleo y por consiguiente activa la transcripción de numerosos genes de enzimas antioxidantes como la hemoxigenasa (HO-1) y la glutamato cisteína ligasa (GCL), mediante su unión a una secuencia específica del ADN denominada ARE (Elemento de Respuesta Antioxidante).

#### 4.4.1.2. Regulación por proteínas desacetilasas

El estado redox celular es fundamental para la regulación de la actividad de las proteínas desacetilasas como las sirtuinas (Bartosz, 2009).

Las sirtuinas (*Silent mating type information regulation 2 homolog*) son proteínas desacetilasas que requieren como cofactor el  $NAD^+$ . Se denominan así porque el miembro fundador de esta familia de proteínas fue Sir2 (*Silent information regulator*) en levaduras. En mamíferos, hay siete tipos de sirtuinas (SIRT 1-7), que se diferencian por su localización celular (núcleo, citoplasma, mitocondria). Su actividad desacetilasa es sensible a los cambios

de NAD<sup>+</sup> intracelular. De esta manera, las sirtuinas actúan como sensores metabólicos del estado redox celular (Alcendor et al., 2007).

La SIRT-1 es la más estudiada en mamíferos porque regula una gran variedad de respuestas celulares como el estrés oxidativo, la senescencia, la supervivencia celular, la apoptosis y la biogénesis mitocondrial; a través de la desacetilación de factores de transcripción como p53 o FoxO3a e histonas, en respuesta al estrés metabólico (Alcendor et al., 2007).

Múltiples estudios han descrito que la restricción calórica y el estrés oxidativo estimulan la expresión de la desacetilasa SIRT-1 con la función de disminuir los niveles de ROS y mantener el estado redox celular (Wang et al., 2007). Asimismo, se ha visto que la SIRT-1 es capaz de regular la biogénesis mitocondrial, mediante la desacetilación de PGC-1 $\alpha$ , que activa diferentes factores de transcripción como PPAR- $\gamma$  (Receptor activado por el proliferador peroxisómico- $\gamma$ ), PPAR- $\alpha$  (Receptor activado por el proliferador peroxisómico- $\alpha$ ) y NRF2, que promueven la expresión de enzimas mitocondriales como COX-IV (citocromo c oxidasa, subunidad IV) (Suliman and Piantadosi, 2014) **(Figura 7)**.

Por ello, la desregulación de la SIRT-1 se ha encontrado involucrada en enfermedades como el cáncer y en el envejecimiento celular (Alcendor et al., 2007).

#### *4.4.1.3. Regulación por proteínas quinasas*

En mamíferos, hay tres clases de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK): las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1, ERK2), las quinasas c-Jun N-terminal (JNK1, JNK2, JNK3) y las MAPKs p38 (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$ , p38 $\delta$ ). Estas proteínas quinasas se encargan de activar la expresión génica que controla la proliferación y la diferenciación celular, dependiente de mitógenos, de factores de crecimiento y citoquinas; y la apoptosis. Actúan mediante la fosforilación de residuos específicos de serina (Ser) o

treonina (Thr) en las proteínas diana. Todas estas vías de las MAPKs pueden ser activadas (además de por mitógenos) por las especies reactivas de oxígeno (McCubrey et al., 2006).

#### 4.4.1.4. Regulación por miARNs

Los microARNs (miARNs) son ARNs endógenos no codificantes, de cadena simple y pequeño tamaño (18-24 nucleótidos). En el año 1993 se descubrió el primer miARN, *Lin-4* en el nemátodo *C. elegans*. Los miARNs se encargan de regular la expresión génica a nivel post-transcripcional, mediante su unión por complementaridad a las regiones 3'-UTR (*untranslated region*) o regiones 5'-UTR de diferentes ARNs mensajeros (ARNm), impidiendo la traducción a proteína, bien inhibiéndola o degradando el ARNm. De este modo, los miARNs controlan la expresión de genes que están involucrados en diversos procesos biológicos como la proliferación, apoptosis y estrés oxidativo, entre otros (Almeida et al., 2011).

#### Papel de los miARNs en la homeostasis redox

Los miARNs juegan un papel fundamental en la regulación de la homeostasis redox celular, siendo ésta primordial en multitud de procesos fisiológicos.

El mecanismo por el cual los miARNs influyen en la señalización redox se basa en la regulación de la expresión de los antioxidantes o de las enzimas implicadas en la generación de las especies reactivas de oxígeno, a nivel celular y tisular. Por ello, en conjunto, estos miARNs están englobados en el término “*redoximiRs*” (Cheng et al., 2013).

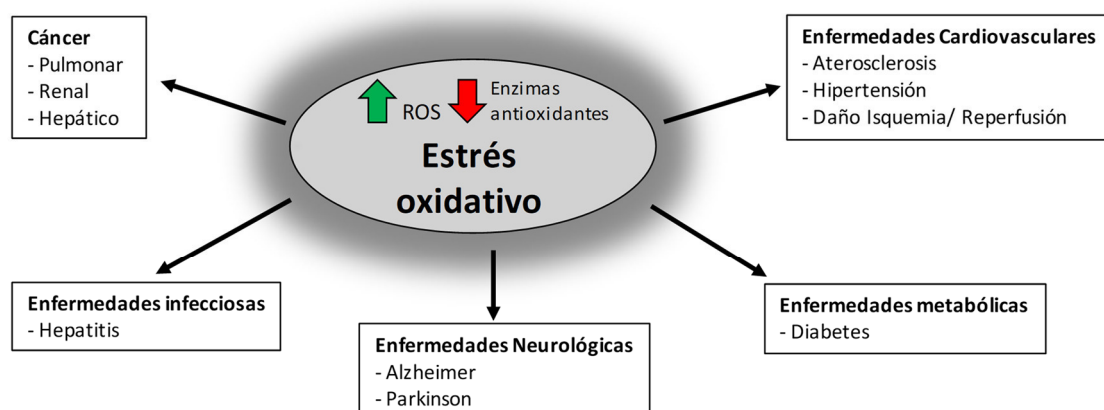
Estudios en células endoteliales microvasculares de cerebro de rata, han indicado que el estrés oxidativo provocado por el peróxido de hidrógeno o por el proceso de envejecimiento, pueden alterar la biogénesis y la maduración de los miARNs (Ungvari et al., 2013).

Por tanto, actualmente existen terapias basadas en miARNs para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas o del envejecimiento acelerado, donde la señalización redox y las defensas antioxidantes se encuentran altamente desreguladas (Cheng et al., 2013).

#### 4.4.2. Enfermedades asociadas al estrés oxidativo

Los niveles de ROS se encuentran controlados por la acción de antioxidantes celulares. Así, en una situación donde la generación de ROS mitocondrial sobrepasa a los niveles de defensas antioxidantes celulares, las proteínas celulares, lípidos y ácidos nucleicos pueden verse seriamente dañadas, llegando hasta la destrucción total de la célula por apoptosis o necrosis (Bartosz, 2009).

Por tanto, el estrés oxidativo contribuye al desarrollo de una gran variedad de patologías que desembocan en las principales causas de mortalidad. Algunas de estas patologías incluyen: enfermedades neurológicas, metabólicas, infecciosas, cardiovasculares y cáncer (**Figura 10**).



**Figura 10. Patologías asociadas con el estrés oxidativo.**

## 5. EL ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento se caracteriza por dos procesos que ocurren conjuntamente: una acumulación excesiva de radicales libres a lo largo del tiempo que oxidan el ADN, las proteínas y los lípidos; produciendo daños moleculares y un deterioro progresivo de los mecanismos protectores frente a estos daños (Cabistol, 2014).

### 5.1. El envejecimiento y su relación con el estrés oxidativo

Se han propuesto muchas teorías para explicar el proceso de envejecimiento. La *Teoría de los Radicales Libres del Envejecimiento* postula que los radicales libres provenientes del oxígeno son los responsables del daño oxidativo, asociado al envejecimiento. Además, los sistemas antioxidantes no son capaces de eliminar todas las especies reactivas de oxígeno que se generan en la célula (Harman, 1956).

A partir de la teoría anterior, se planteó la *Teoría Mitocondrial del Envejecimiento Celular*, la cual defiende que, en la mitocondria durante el proceso de fosforilación oxidativa, se genera daño oxidativo en las macromoléculas mitocondriales como el ADN o las proteínas, siendo el responsable del envejecimiento. Además, estos daños desencadenan una mayor acumulación del ROS mitocondrial, el agotamiento del ATP y finalmente la muerte celular (Harman, 1972).

Sin embargo, la teoría del envejecimiento más actual es la propuesta por *Sahin y cols. (2011)*, que postula que la rotura de los telómeros de los cromosomas, como consecuencia del aumento del estrés oxidativo a lo largo del tiempo, conduce a los múltiples daños celulares que se observan en el proceso de envejecimiento. De tal manera, disminuye la expresión de genes que controlan la defensa antioxidante y las proteínas reguladoras de diversas vías como la biogénesis mitocondrial (Sahin et al., 2011).

## **5.2. Alteraciones metabólicas asociadas al envejecimiento: diabetes tipo**

### **2**

El envejecimiento está determinado por un deterioro en el mantenimiento de los procesos homeostáticos, que conduce al desarrollo de enfermedades como la diabetes tipo 2, entre otras. En este caso, el proceso de envejecimiento se caracteriza metabólicamente por: el desarrollo de resistencia a la acción de la insulina, cambios en la composición corporal y disfunción mitocondrial. Además, durante el envejecimiento se desarrolla hiperinsulinemia e intolerancia a la glucosa (Catalano et al., 2005). Asimismo, el envejecimiento se caracteriza por: gluconeogénesis hepática descontrolada, incremento de lipogénesis adiposa, defectos en la síntesis de glucógeno y en la captación de la glucosa en el músculo esquelético (Barzilai et al., 2012).

Durante el envejecimiento se produce un incremento de la grasa visceral, siendo uno de los principales contribuyentes de la resistencia a la insulina y del desarrollo de la diabetes tipo 2. Igualmente, conlleva un aumento de citoquinas proinflamatorias, que interfieren en la acción de la insulina (Barzilai et al., 2012).

Otra de las consecuencias del envejecimiento es la pérdida progresiva de la función mitocondrial en varios tejidos como el hígado o músculo esquelético. Así, determinados estudios afirman que en el envejecimiento existe una asociación entre la resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, junto con la reducción de la actividad oxidativa mitocondrial y de la síntesis de ATP (Barzilai et al., 2012).

## **5.3. El envejecimiento en el hígado**

El hígado sufre cambios moleculares durante el envejecimiento como el aumento de la respuesta inflamatoria, la desregulación de la expresión génica de enzimas antioxidantes

y la disfunción mitocondrial; alterándose significativamente la homeostasis redox celular (Kim et al., 2015).

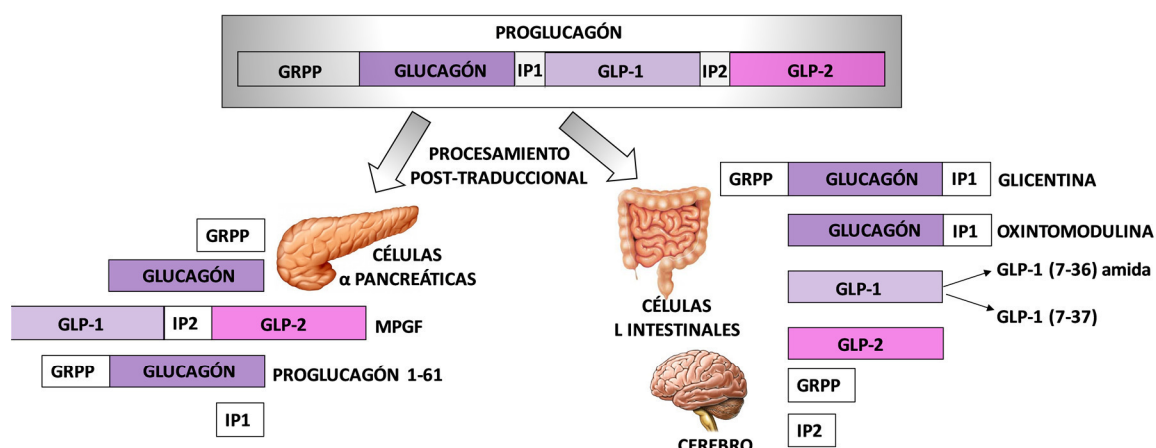
Además, con los años disminuye la capacidad de regeneración hepática, lo que afecta considerablemente a la función hepática. Determinados estudios han afirmado que el silenciamiento epigenético juega un papel fundamental en la inhibición de la proliferación hepática, dependiente de la edad (Kim et al., 2015).

## **6. PÉPTIDO SIMILAR AL GLUCAGÓN TIPO 1 (GLP-1) Y SU IMPLICACIÓN EN EL ESTRÉS OXIDATIVO**

### **6.1. Síntesis y procesamiento del proglucagón**

El gen del proglucagón se expresa en las células  $\alpha$  pancreáticas, células L del intestino y en las neuronas localizadas en el hipotálamo y el tronco encefálico.

El procesamiento post-traducciona del proglucagón es dependiente de tejido como consecuencia de la expresión diferencial de un grupo de enzimas denominadas prohormonas convertasas (PC), caracterizadas por romper la molécula en lugares específicos (Baggio and Drucker, 2007). Se ha visto que, en las células  $\alpha$  pancreáticas el proglucagón se escinde dando lugar al glucagón y a otros péptidos biológicamente inactivos, en cambio, en las células L del intestino y en el cerebro, esta proteólisis origina predominantemente a los péptidos similares al glucagón tipo 1 y 2 (GLP-1, GLP-2). Posteriormente, el GLP-1 se procesa nuevamente generando las formas amidas y truncadas. Este péptido está presente en dos formas activas en el plasma sanguíneo: GLP-1 (7-37) y GLP-1 (7-36) amida. Esta última es la forma más abundante en humanos (Baggio and Drucker, 2007; Hurtado-Carneiro et al., 2013b; Janssen et al., 2013) (**Figura 11**).



**Figura 11. Procesamiento post-traduccion del gen del proglucagón.**

Péptido similar al glucagón (GLP), péptido pancreático relacionado con la glicentina (GRPP), péptido intermedio (IP), fragmento mayor del proglucagón (MPGF).

## 6.2. Péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1)

El péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) es un péptido de 30 aminoácidos cuya secuencia está altamente conservada en mamíferos (Lee, 2016).

### 6.2.1. Secreción y degradación del GLP-1

Los niveles plasmáticos de GLP-1 son bajos, en condiciones de ayuno, sin embargo, tras una ingesta de alimentos, la concentración puede aumentar de 2 a 5 veces, dependiendo del tamaño y la composición de la comida (Janssen et al., 2013).

El GLP-1 es secretado por las células L intestinales localizadas principalmente en el íleon distal y colon (Lee, 2016). La secreción es estimulada por la ingesta oral de glucosa y otros nutrientes como ácidos grasos o aminoácidos esenciales. Así, el GLP-1 es liberado rápidamente a la circulación sanguínea, siguiendo un patrón bifásico, con una fase temprana (a los 10-15 minutos), seguido de una segunda fase más tardía (a los 60 minutos), tras la ingesta de nutrientes (Janssen et al., 2013). También, se ha visto que el GLP-1 se



produce en ciertas regiones del cerebro como el núcleo del tracto solitario (Trapp and Richards, 2013).

La vida media del GLP-1 endógeno en plasma es muy corta (1-2 minutos) ya que una vez secretado es degradado rápidamente por la proteasa dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), eliminándose principalmente a través del riñón (Lee, 2016).

### 6.2.2. Mecanismo de acción del GLP-1

El GLP-1 ejerce su acción insulínica uniéndose al receptor GLP-1 (GLP-1R) en las células  $\beta$  pancreáticas. El GLP-1R es un receptor acoplado a proteínas G y se expresa fundamentalmente en los islotes pancreáticos, cerebro, corazón, pulmón, hígado, intestino grueso y estómago. Asimismo, el receptor del GLP-1 ha sido localizado en regiones cerebrales implicadas en el control de la ingesta (Alvarez et al., 1996; Hurtado-Carneiro et al., 2013b).











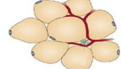













De este modo, el GLP-1 al unirse al receptor acoplado a proteínas G, produce un aumento del adenosín monofosfato cíclico (AMPC) intracelular y activa a la proteína quinasa A (PKA), la cual cierra los canales de potasio sensibles al ATP y, a la vez, induce un aumento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , llevando a cabo finalmente sus acciones insulínicas (Amori et al., 2007).

### 6.2.3. Efectos fisiológicos del GLP-1

El GLP-1 tiene múltiples funciones biológicas que afectan a los tejidos periféricos y al sistema nervioso central (**Tabla 4**).

Cabe destacar su actividad como hormona incretina, pues regula los niveles de glucosa en sangre activando la síntesis y la secreción de la insulina, en condiciones postprandiales e inhibiendo la del glucagón en las células  $\alpha$  pancreáticas. Además, el GLP-1

es conocido por ser un péptido anorexigénico, es decir, estimula los centros hipotalámicos que controlan la saciedad e inhibe la ingesta (Alvarez et al., 2005; Uccellatore et al., 2015). Además, este péptido promueve la proliferación de células  $\beta$  pancreáticas, previene la apoptosis y retrasa el vaciado gástrico (**Tabla 4**). Por todo ello, las diversas actividades metabólicas del GLP-1 le conduce a ser utilizado como agente terapéutico de patologías como la obesidad o la diabetes tipo 2.

Órgano/Tejido	Efecto Fisiológico del GLP-1
<b>Hígado</b> 	 Síntesis de glucógeno
<b>Músculo</b> 	 Sensibilidad a insulina  Síntesis de glucógeno y oxidación de glucosa
<b>Páncreas</b> 	 Biosíntesis de insulina  Proliferación de células $\beta$ pancreáticas  Apoptosis de células $\beta$  Secreción de glucagón por las células $\alpha$
<b>Tejido Adiposo</b> 	 Síntesis de glicerol y ácidos grasos
<b>Estómago</b> 	 Vaciamiento gástrico  Motilidad intestinal
<b>Pulmón</b> 	 Secreción mucosa y relajación traqueal
<b>Corazón</b> 	 Cardioprotección
<b>Cerebro</b> 	 Saciedad  Ingesta  Neuroprotección  Supervivencia celular neuronal

**Tabla 4. Efectos biológicos del GLP-1 en tejidos periféricos y sistema nervioso central (SNC).**

Sin embargo, su corta vida media, implica la utilización de diferentes análogos estructuralmente similares pero resistentes a la enzima DPP-4 como es la exendina-4, que tiene una actividad biológica más prolongada por ser más estable *in vivo*. Este análogo se ha visto que tiene efectos beneficiosos a largo plazo, sobre los niveles de glucosa en sangre en ratones, ratas y humanos diabéticos (Greig et al., 1999; Khorsandi et al., 2016; Sinclair and Drucker, 2005).

### 6.3. El Papel del GLP-1 en el estrés oxidativo

El estrés oxidativo ocasiona cambios funcionales y estructurales en la mitocondria, que causan la activación de los factores proapoptóticos, la disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas y el desarrollo de la resistencia a la acción de la insulina.

Estudios realizados en ratones diabéticos o con Parkinson han descrito que el GLP-1 disminuye la producción de ROS, a la vez que incrementa la expresión génica de enzimas antioxidantes como la SOD, la CAT y la GPx. Además, produce un aumento de la concentración del glutatión plasmático (Athauda and Foltynie, 2016; Petersen et al., 2016). Asimismo, la activación del receptor del GLP-1 estimula la síntesis de ATP, incrementa la tasa de consumo de oxígeno e influye en la función mitocondrial, aumentando la biogénesis, tanto en el número como en la masa mitocondrial (Kang et al., 2015). Igualmente, el tratamiento prolongado en células  $\beta$  pancreáticas con exendina-4 activa la expresión de la SIRT-1 o de factores de transcripción como PGC-1 $\alpha$ , el principal regulador de la biogénesis mitocondrial (Athauda and Foltynie, 2016) y reduce la apoptosis, promoviendo la supervivencia y la proliferación celular (Li et al., 2013).

Por tanto, la exendina-4 muestra efectos muy positivos, pues disminuye la producción de ROS, aumenta la capacidad antioxidante y es antiapoptótica, siendo una buena herramienta terapéutica para la diabetes tipo 2.

#### **6.4. Implicación del GLP-1 en el envejecimiento**

Determinados estudios han señalado que los niveles plasmáticos de GLP-1 disminuyen durante el envejecimiento, a pesar de que su forma activa apenas variase (Fan et al., 2011). Aunque, otras investigaciones evidencian que la concentración plasmática de GLP-1 no varía (MacIntosh et al., 2001). Además, se ha confirmado que tras una ingesta hiperlipídica, en pacientes envejecidos se eleva la secreción de GLP-1, pudiendo contribuir a la supresión del apetito y al menor consumo energético, favoreciéndose la pérdida de peso (Atalayer and Astbury, 2013).

Sin embargo, los efectos terapéuticos que tienen los análogos del GLP-1 como la exendina-4 durante el envejecimiento no han sido todavía investigados.



---

*OBJETIVOS*



El objetivo principal de esta tesis doctoral fue estudiar la función del sensor metabólico, la proteína quinasa con dominios PAS (PASK), en el metabolismo oxidativo hepático, analizando la respuesta frente a diferentes estados nutricionales (alimentación y ayuno), y su relación con el estrés oxidativo y el envejecimiento. De este modo, nosotros proponemos que PASK podría controlar el estado redox celular en el hígado y desempeñar un papel primordial en la función mitocondrial. Asimismo, se propuso el estudio del papel regulador del péptido anorexigénico GLP-1 en el metabolismo oxidativo, la función mitocondrial y en la señalización de PASK.

En concreto, los objetivos específicos propuestos fueron:

1. Estudiar el efecto de la deficiencia de PASK en la producción endógena de ATP, especies reactivas de oxígeno y la expresión génica de algunas enzimas redox, en respuesta a distintos estados nutricionales.
2. Analizar el papel de PASK sobre la regulación de la expresión de factores de transcripción y proteínas claves en el control de la homeostasis del estado redox celular, ante situaciones de ayunos prolongados.
3. Analizar el efecto del estado nutricional y del tratamiento con exendina-4 sobre la expresión hepática de PASK, y asimismo estudiar la función de PASK en la acción reguladora de la exendina-4 en el metabolismo oxidativo.
4. Estudiar el papel de PASK en las alteraciones metabólicas producidas durante el envejecimiento, relacionadas con la homeostasis de la glucosa, el estrés oxidativo y la función mitocondrial.



5. Evaluar el efecto del envejecimiento en la producción fisiológica de GLP-1 y en la expresión de su receptor en hígado, así como en la acción antioxidante, la función y la biogénesis mitocondrial, en respuesta a tratamientos con exendina-4. Todo ello considerando la posible mediación de PASK en esta respuesta.





## **1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Todos los procedimientos que implicaron la utilización de animales siguieron las normas del cuidado de animales especificadas por la Unión Europea (Real Decreto 542/2016, BOE núm.297 LEY 32/2007) y aprobadas por el Comité Institucional de Experimentación Animal.

En estos experimentos, se utilizaron ratones machos de 25 a 30 g de peso de la cepa C57BL/6J, tanto de tipo silvestres (WT) (obtenidos por Charles River Laboratories International, Inc.) como deficientes en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) cedidos amablemente por el Prof. Roland H. Wenger (Instituto de Fisiología, Universidad de Zurich CH-8057, Suiza), de edades comprendidas entre los 3 y los 24 meses. En los ensayos de envejecimiento, se emplearon ratones jóvenes de 3-5 meses y envejecidos de 18-20 meses de edad.

Todos los animales se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid (que cumple con los requerimientos legislativos relativos a la experimentación animal (D.C. 86/609/CEE; RD 1201/2005)), alimentados *ad libitum* con una dieta estándar de pellets (590 g de carbohidratos, 30 g de lípidos y 160 g de proteínas por kilogramo de dieta) y alojados a una temperatura constante (21 °C) en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, comenzando el ciclo de luz a las 8:00 am.

Antes de realizar cualquier tipo de experimento, los animales permanecieron, al menos una semana, en el animalario con el fin de que estuvieran aclimatados.

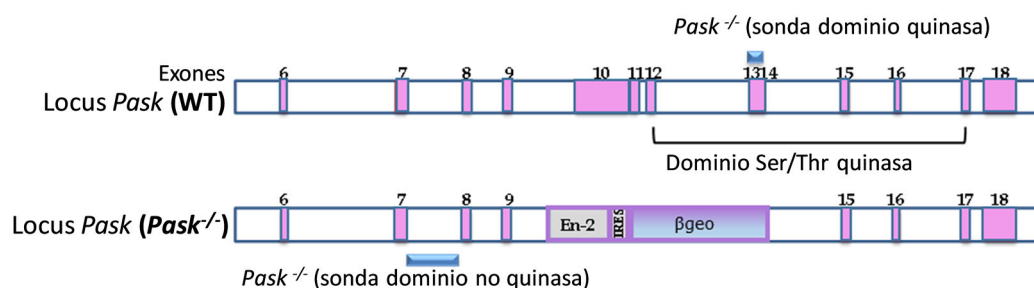
Los estudios se realizaron con los informes favorables del Comité de Experimentación Animal y de la Comunidad Autónoma de Madrid (Ref: 315/15).

### **1.1. Generación de ratones deficientes en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>)**

Los ratones deficientes en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) fueron generados por Wenger y cols., mediante el reemplazamiento del fragmento de ADN que contenía la secuencia responsable

de la actividad quinasa, por el gen de fusión *neo-lac Z* ( $\beta$ -geo), que codifica a la  $\beta$ -galactosidasa. Por lo tanto, estos ratones presentaban la función quinasa de la proteína PASK bloqueada (**Figura 12**).

La deficiencia en PASK de estos ratones se comprobó analizando la expresión del ARNm de *Pask* mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), usando para ello dos sondas distintas: una específica para el dominio serina/treonina quinasa y otra para los exones 7 y 8 de la *Pask* (**Figura 12**).



**Figura 12. Representación esquemática del dominio quinasa reemplazado en ratones *Pask*<sup>-/-</sup> y la localización de las sondas utilizadas en la PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).**

## 2. EXPERIMENTOS *in vivo*

### 2.1. Análisis de la actividad metabólica de los ratones

La actividad metabólica se analizó en ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup>, de 9 meses de edad, mediante el uso de jaulas metabólicas (sistema Phenomaster) en la Unidad de Calorimetría Indirecta y Metabolismo Energético (UCIME) del CIBERDEM.

Inicialmente, los animales fueron adaptados a las jaulas metabólicas durante 4 días, y a continuación se valoró la producción de CO<sub>2</sub> (VCO<sub>2</sub>), el consumo de O<sub>2</sub> (VO<sub>2</sub>) y la ingesta de comida. Estas medidas se repitieron cada 15 minutos, durante 3 días consecutivos, en cada uno de los ratones. Los datos medios obtenidos desde las 20:00 pm hasta las 8:00 am

se expresaron como valores nocturnos y los obtenidos entre las 8:00 am y 20:00 pm como valores diurnos.

## **2.2. Medida del peso corporal en ratones a distintas edades**

Se determinó el peso corporal de ratones machos de la cepa C57BL/6J, de tipo WT y *Pask<sup>-/-</sup>*, a distintas edades. Para ello, los ratones fueron clasificados en distintos grupos, según la edad (meses): 3-6; 7-12; 13-15; 16-20; 21-24. Después, los ratones fueron pesados usando la balanza (Mettler PE 2000), y siempre a la misma hora para minimizar posibles variaciones durante el día.

## **2.3. Test de tolerancia a glucosa (TTG) e insulina (TTI)**

Se valoró la concentración de glucosa en sangre a distintos tiempos, tras la inyección de glucosa o de insulina (test de tolerancia a la glucosa (TTG) y test de tolerancia a la insulina (TTI), respectivamente). Ello era un indicativo de la respuesta fisiológica a la acción de la insulina y si se producía o no resistencia de dicha hormona, como consecuencia del proceso de envejecimiento. Los grupos considerados fueron ratones WT y *Pask<sup>-/-</sup>* de 3-5 meses (jóvenes) y de 18-20 meses (viejos).

Para la realización del test de tolerancia a la glucosa, los ratones fueron ayunados durante toda la noche, momento en el cual se tomó la medida de glucosa en sangre periférica obtenida de la cola del animal, mediante un glucómetro (Bayer Corp., Elkhart, IN, EEUU). Tras ello, se inyectó glucosa (2 g/kg peso) intraperitonealmente y se tomaron medidas de la glucosa circulante en sangre de la cola, a distintos tiempos (30, 60, 90 y 120 minutos).

Mientras que, para el test de tolerancia a la insulina, los ratones fueron ayunados durante 4 horas e inyectados con insulina (1 U/kg peso) intraperitonealmente. Las valoraciones de la glucosa en sangre obtenidas de la cola del animal se realizaron mediante

un glucómetro en el momento inicial (antes de la inyección de insulina, considerado tiempo 0) y a distintos tiempos (15, 30, 60, 90 y 120 minutos).

Además, se calculó el índice HOMA-IR, empleado para evaluar la resistencia a la insulina, utilizando como parámetros la glucosa y la insulina en ayunas.

$$\text{HOMA-IR} = [\text{GLUCOSA SÉRICA EN AYUNO (mmol/L)} \times \text{INSULINA EN AYUNO (mU/L)}] / 22,5$$

Los valores entre 0,5-2,0 se consideran normales, mientras que valores >2,9 indican gran susceptibilidad a desarrollar resistencia a la insulina.

## **2.4. Tratamientos de los ratones: ayuno/alimentación y exendina-4**

Tanto los ratones WT como los *Pask<sup>-/-</sup>*, fueron ayunados durante 24 ó 48 horas. Un grupo de ratones se alimentaron con la dieta estándar descrita anteriormente, considerándose los basales.

Además, algunos ratones fueron inyectados subcutáneamente, bien con exendina-4 (250 ng/100 g de peso) (Bachem) diluida en suero salino, o bien con suero salino (0,9 % NaCl) que contenía 0,25 % de albúmina sérica, durante 3 horas, y finalmente fueron sacrificados.

## **3. TÉCNICAS *in vitro***

### **3.1. Estudio de algunos parámetros bioquímicos**

#### 3.1.1. Valoración de la concentración de insulina en plasma

Se valoró la concentración de insulina en plasma de 4-5 ratones de 3-5 y 18-20 meses de edad, mediante un ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Dicha técnica está basada en la detección de un antígeno mediante un anticuerpo primario, y que éste a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado una enzima, que genera un producto final detectable mediante espectrofotometría (Hnasko, 2015).

La concentración de insulina se determinó siguiendo las instrucciones del protocolo del kit *“Rat/Mouse Insulin ELISA”* (Millipore, MA, EEUU). Para ello, una vez sacrificado el ratón, se recogió la sangre y se añadió Aprotinina a una concentración final de 50 Kiu/mL y EDTA a 0,12 mg/mL, para evitar su coagulación y su degradación por proteasas. Después, las muestras fueron centrifugadas a 18.000 x g durante 5 minutos y el sobrenadante (plasma) fue retirado a otro tubo.

En primer lugar, se añadieron 10 µL de *“Buffer Assay”* (tampón fosfato salino 0,05 M; pH 7,4; conteniendo EDTA 0,025 M; 0,08 % de azida sódica y 1 % de BSA) y se incorporaron 10 µL del plasma. Después, se añadieron 80 µL de *“Detection Antibody”*, el cual lleva incorporado el anticuerpo monoclonal anti-insulina específico de ratón. Y se incubó durante 2 horas, a temperatura ambiente. Se realizaron varios lavados con *“Buffer Wash”* (Tris 50 mM, Tween-20) para eliminar los restos sobrantes. Luego, se incorporaron 100 µL de *“Enzyme Solution”*, y se incubó durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Se realizaron 6 lavados con *“Buffer Wash”*, para eliminar el material no retenido. La cuantificación de los conjugados anticuerpo-enzima se realizó en presencia del sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Finalmente, la reacción fue parada mediante 100 µL de *“Stop Solution”* (HCl 0,3 M).

La actividad enzimática fue medida en un espectrofotómetro (SYNERGY/HTX MULTIMODE, BIOTEK) a dos longitudes de onda (450 y 590 nm). Los resultados fueron extrapolados en una curva estándar generada por concentraciones conocidas de insulina (10; 5; 2; 1; 0,5; 0,2 ng/mL).

### 3.1.2. Valoración de la concentración plasmática de GLP-1

Se valoró la concentración de GLP-1 en plasma de ratones C57BL/6J de 3-5 y 18-20 meses de edad, a través de un ELISA, y siguiendo las instrucciones del protocolo del kit *“High*



*Sensitivity GLP-1 active*” (Millipore, MA, EEUU). Para ello, una vez sacrificado el ratón, se recogió el plasma tal y como se indicó en el apartado 3.1.1.

Primeramente, se añadieron 50  $\mu$ L de “*Buffer Assay*” (tampón fosfato salino 0,05 M; pH 7,4; conteniendo EDTA 0,025 M; 0,08 % de azida sódica y 1 % de BSA), y se incorporaron 50  $\mu$ L del plasma. A continuación, se añadieron 20  $\mu$ L del anticuerpo “*GLP-1 capture*”, y se incubó durante 2 horas, a temperatura ambiente. Después, se realizaron varios lavados con “*Buffer Wash*” (Tris 50 mM, Tween-20), para eliminar los restos sobrantes. Luego, se incorporaron 100  $\mu$ L de “*Detection Antibody*”, y se incubó durante 1 hora, a temperatura ambiente. Se realizaron varios lavados con “*Buffer Wash*”. Posteriormente, se añadieron 100  $\mu$ L de “*Enzyme Solution*”, y se incubó durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Se realizaron 6 lavados con “*Buffer Wash*”, para eliminar el material no retenido. La cuantificación de los conjugados anticuerpo-enzima se realizó en presencia de un sustrato quimioluminiscente. Finalmente, la reacción fue parada mediante 100  $\mu$ L de “*Stop Solution*” (HCl 0,3 M).

La actividad enzimática fue medida en un luminómetro (SYNERGY/HTX MULTIMODE, BIOTEK) a una longitud de onda de 425 nm. Los resultados fueron extrapolados en una curva estándar generada por concentraciones conocidas de GLP-1 (38; 13; 4; 1; 0,5; 0,2 pM).

### 3.1.3. Estudio del perfil lipídico

Se determinaron algunos parámetros característicos del metabolismo lipídico como el colesterol total (CT), colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad y baja densidad (C-HDL y C-LDL, respectivamente) y los triglicéridos (TG), en plasma de ratón de 3-5 y de 18-20 meses de edad. Éstos fueron medidos mediante el Test “cobas Lipid Panel”, usando el instrumento cobas b 101 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), basado en un sistema de diagnóstico *in vitro* diseñado para la determinación cuantitativa de parámetros lipídicos.

### **3.2. Técnicas biomoleculares en células (MEFs) e Hígado**

#### **3.2.1. Aislamiento, Cultivo y Tratamientos de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)**

Los MEFs fueron aislados a partir de embriones de ratón de 13,5 días de gestación. Para ello, las hembras preñadas (WT o *Pask*<sup>-/-</sup>) fueron sacrificadas y los fetos fueron recogidos de las ramas uterinas. A continuación, los embriones se decapitaron, se eliminaron las vísceras y se tripsinizaron durante 3-5 minutos, disgregándolos con la ayuda de una jeringa. Después, los restos celulares fueron eliminados por centrifugación (2.142 x g, durante 5 minutos) y los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) aislados se cultivaron.

Los MEFs se cultivaron en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Lonza) suplementado con glucosa (4,5 g/L), 15 % de suero bovino fetal (FBS) (Lonza) inactivado a 56 °C durante 30 minutos, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 mg/mL) y glutamina (2 mM). Las células fueron mantenidas en un ambiente húmedo con 5 % de CO<sub>2</sub>, a 37 °C.

Las células fueron ayunadas con un medio sin suero (Gibco) y a 2,5 mM de glucosa, durante 2 horas y luego fueron tratadas a diferentes concentraciones de glucosa (2,5 ó 20 mM) durante otras 2 horas más. En algunos casos, las células no fueron tratadas, considerándose como controles (CULTIVO STD). Por otro lado, las células fueron sometidas a estrés, mediante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a una concentración de 200 µM, durante 2 horas.

#### **3.2.2. Homogenización de las muestras de hígado de ratón**

Una vez que los ratones fueron sometidos al tratamiento correspondiente, se sacrificaron por dislocación cervical, sin el uso de ningún anestésico. Después, se procedió inmediatamente a la apertura de la cavidad abdominal para la extracción del hígado.

Se cortó un pequeño trozo de tejido (~150 mg) que fue rápidamente congelado en nitrógeno líquido. A continuación, se homogenizó en el tampón de lisis RIPA (PBS 1X; 1 % de NP-40; 0,5 % de deoxicolato sódico; 1 % de SDS; FNa 10 mM; Leupeptina 10 mg/mL; PMSF 100 mM; ortovanadato sódico 1 mM; pirofosfato sódico 2,5 mM) y una pastilla de cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El tejido se expuso durante 5 segundos a irradiación por microondas (Hurtado-Carneiro et al., 2012) y se sonicó durante 30 segundos. Finalmente, el homogenado fue centrifugado a 12.000 x g, durante 10 minutos, para eliminar los restos insolubles.

### 3.2.3. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína fue determinada siguiendo las instrucciones del protocolo del kit “*Protein ASSAY*” (Bio-Rad), basado en el método de Lowry. Éste es una técnica colorimétrica, en la cual el ion cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ), en condiciones alcalinas, se une a los enlaces peptídicos de las proteínas, reduciéndose a ion cuproso ( $\text{Cu}^+$ ). Estos iones unidos a los enlaces reducen posteriormente al reactivo de Folin que pasa de un color amarillo inicial a un color azul en su forma reducida. Así, las concentraciones de las proteínas son directamente proporcionales al incremento del color (Lowry et al., 1951).

Para medir la concentración de proteína, las muestras fueron diluidas 1: 5 y los datos fueron medidos en el espectrofotómetro Varioskan (Thermo Fisher Scientific) a una longitud de onda de 750 nm. Los resultados fueron extrapolados en una recta patrón elaborada a partir de concentraciones conocidas de la proteína albúmina bovina sérica (3,2; 1,6; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ).

### 3.2.4. Identificación y caracterización de proteínas mediante Western blot

Para la detección y caracterización de proteínas se utilizó la técnica de Western blot o inmunoblot, basada en la separación de las proteínas, mediante electroforesis e inmunotransferencia, que permite la identificación de proteínas específicas de una compleja mezcla de proteínas, siendo reconocidas por su unión a un anticuerpo específico (Burnette, 1981).

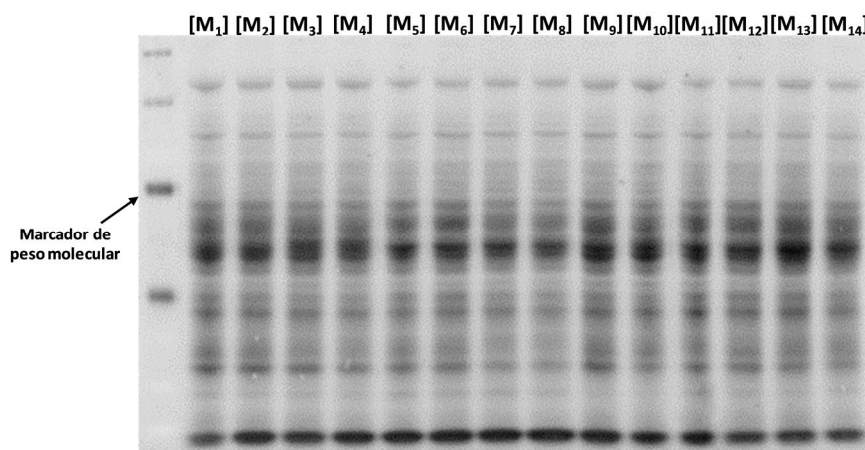
Los homogenados de hígado fueron diluidos en tampón Laemmli 5X (Tris-HCl 60 mM; pH 6,8; 2 % de SDS; 10 % de glicerol; 5 % de  $\beta$ -mercaptoetanol; 0,01 % azul de bromofenol) y se hirvieron durante 5 minutos a 100 °C. Para la electroforesis, se cargaron 20-40  $\mu$ g de proteína en geles de poliacrilamida Stain-Free al 10 % (Mini-PROTEAN TGX Stain-Free<sup>®</sup>TM Precast Gels, Bio-Rad). La electroforesis se realizó en un Buffer que contenía glicina 192 mM, Tris 25 mM y 10 % de SDS. El peso molecular de las proteínas se determinó mediante el uso de un marcador de pesos moleculares (Spectra Multicolor, Thermo Scientific).

Anticuerpo	Hospedador	Casa comercial	Dilución usada
Anti-AKT	Ratón	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EEUU	1: 1.000
Anti-COXIV	Ratón	GeneTex, Irvine, EEUU	1: 2.000
Anti-fosfo AKT1/PKB (Ser473)	Conejo	Millipore Iberica, Madrid, España	1: 1.000
Anti-fosfo ERK1/2 (Thr202/185)	Conejo	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EEUU	1: 1.000
Anti-GCLm	Ratón	Sigma Aldrich, Madrid, España	1: 5.000
Anti-ERK1/2	Conejo	Millipore Iberica, Madrid, España	1: 2.000
Anti-NRF2	Conejo	GeneTex, Irvine, EEUU	1: 1.000
Anti-p53	Conejo	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EEUU	1: 1.000
Anti-PCNA	Ratón	Abcam, Cambrigde, Reino Unido	1: 1.000
Anti-PGC1 $\alpha$	Ratón	Millipore Iberica, Madrid, España	1: 1.000
Anti-SIRT1	Conejo	Santa Cruz Biotechnology, Texas, EEUU	1: 500
Anti-SODMn	Conejo	GeneTex, Irvine, EEUU	1: 1.000
Anti-Conejo-HRP	Cabra	Millipore Iberica, Madrid, España	1: 10.000
Anti-Ratón-HRP	Cabra	Bethyl Laboratories, Montgomery, EEUU	1: 10.000

**Tabla 5. Anticuerpos y condiciones empleadas en los ensayos de Western blot.**

A continuación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Immun-Blot@PVDF, Bio-Rad), utilizando el sistema de transferencia en semiseco con Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). Para evitar interacciones inespecíficas en la inmunodetección, las membranas se bloquearon con solución de bloqueo: TBS (NaCl 1,4 M; Tris 20 mM), conteniendo 0,1 % de Tween-20 (TBS-T) y leche al 5 %, durante 1 hora, a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 5**) diluido en TBS-T con leche al 5 %, durante toda la noche, a 4 °C y en agitación. Después, las membranas se lavaron 3 veces, durante 10 minutos con TBS-T, y se incubaron con el anticuerpo secundario específico (**Tabla 5**) diluido en TBS-T con leche al 5 %, durante 1 hora, a temperatura ambiente.

Las membranas de PVDF donde se transfirieron las proteínas a partir de los geles Stain-Free, fueron usadas como controles de carga (Gilda and Gomes, 2013), activándolas previamente con UV durante 2 minutos, y visualizándolas mediante el Sistema Bio-Rad Chemidoc MP (**Figura 13**) (Ver Anexos).



**Figura 13. Membrana representativa de PVDF donde se visualizan las proteínas totales cargadas en cada carril.**

Las proteínas totales se detectaron mediante iluminación UV en una membrana de PVDF sobre las que se transfirieron desde un gel Stain-Free. Las diferencias entre los carriles fueron corregidas por cuantificación de las proteínas teñidas en cada carril.

Finalmente, las bandas específicas detectadas por el anticuerpo fueron visualizadas mediante quimioluminiscencia y sus intensidades fueron cuantificadas mediante el software Quantity One (Bio-Rad, GS800 Densitometer).

### 3.2.5. Extracción del ARN total a partir de hígado y síntesis del ADNc

El ARN total de hígado de los ratones fue extraído mediante el método del TRIzol (Life Technologies, Barcelona, España).

El tejido fue homogenizado en TRI Reagent (Life Technologies, Barcelona, España) con la ayuda de un POLYTRON PT2100 (Kinematica AG, Suiza). A continuación, las muestras se centrifugaron a 18.000 x g durante 10 minutos, a 4 °C para eliminar los restos insolubles. Después, se añadieron 200 µL de cloroformo para la extracción del contenido lipídico de la muestra, se agitó suavemente durante 15 segundos y se centrifugó a 18.000 x g durante 15 minutos, a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa, que contenía el ARN, a un nuevo tubo, y se añadieron 500 µL de 2-propanol y se centrifugó a 18.000 x g durante 10 minutos, a 4 °C. Así, el ARN precipitado formó un pequeño pellet que se lavó 2 veces con etanol al 75 % y se centrifugó varias veces a 4.500 x g durante 10 minutos. Brevemente, se dejó secar el pellet a temperatura ambiente para que se evaporasen los posibles restos de etanol. Finalmente, se disolvió el pellet en 20 µL de agua libre de ARNasas.

#### *3.2.5.1. Medida de la concentración y pureza del ARN*

La cuantificación del ARN se llevó a cabo por espectrofotometría. Esta técnica está basada en la determinación de la absorbancia de la muestra frente a un blanco en dos longitudes de onda (260 y 280 nm). El cociente entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm indica el grado de pureza del ARN. De forma que valores comprendidos entre 1,8 y 2,0 señalan que el ARN extraído es de buena pureza. La concentración del ARN fue determinada

en el Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). La cantidad y la integridad de los ARNs extraídos se valoraron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 % en tampón TAE (Tris 40 mM; ácido acético 20 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0).

#### *3.2.5.2. Síntesis de ADNc: Retrotranscripción (RT)*

Este proceso consiste en la obtención de un ADN complementario (ADNc), a partir del ARN mensajero (ARNm). Por tanto, es el proceso inverso de la transcripción y son necesarias ADN polimerasas específicas denominadas transcriptasas inversas (Baltimore, 1970).

La síntesis del ADNc fue llevada a cabo siguiendo las instrucciones del protocolo del kit “*High-capacity cDNA archive*” (Applied Biosystems), utilizando 2 µg de ARN como molde, en un volumen final de 20 µL, e incubando la mezcla de reacción a 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 120 minutos y 91 °C durante 10 minutos. El ADNc obtenido se guardó a -20 °C hasta amplificarlo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### *3.2.6. Amplificación del ADNc: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)*

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) es un método que permite amplificar un fragmento específico de ADN. Actualmente, la PCR cuantitativa a tiempo real es el método más sensible y exacto para la determinación de los niveles de ARNm. Esta técnica permite detectar directamente el producto amplificado durante la fase exponencial de la reacción, a través del uso de compuestos que emiten fluorescencia cuando el ADN está en forma de doble hélice. De este modo, el incremento de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN amplificado (Watson, 2004).

Los niveles de expresión del ARNm fueron determinados por qRT-PCR, utilizando la tecnología de SYBR Green (Applied Biosystems) o Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA), según correspondiese.

Gen (Nombre proteína)	Oligonucleótido Forward Ratón	Oligonucleótido Reverse Ratón
<i>Actb</i> (β-ACTINA)	5'-CTCTCTTCCAGCCTTCCTTC-3'	5'-GGTCTTTACGGATGTCAACG-3'
<i>ARNr 12S</i> (12S) (mitochondrial)	5'-CAAACCTGGGATTAGATACCCAC-3'	5'-GAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3'
<i>Cat</i> (CAT)	5'-GAATGGGTATGGTCCACACA-3'	5'-CAAGTTTTTGATGCCCTGGT-3'
<i>CoxIV</i> (COXIV)	5'-TGAATGGAAGACAGTTGTGGG-3'	5'-GATCGAAAGTATGAGGGATGGG-3'
<i>Cs</i> (CS)	5'-GGGACTTGTGTATGAGACTTCG-3'	5'-AGCCAAAATAAGCCCTCAGG-3'
<i>FoxO3a</i> (FoxO3a)	5'-TACGAGTGGATGGTGCCTG-3'	5'-AGGTTGTGCCGGATGGAGTTC-3'
<i>Gcll</i> (GCLC)	5'-AGGCTCTCTGCACCATCACT-3'	5'-CTCTGGGTTGGGTCTGTGT-3'
<i>Gclm</i> (GCLM)	5'-TGTGTGATGCCACCAGATTT-3'	5'-GATGATCCCTGCTCTTCA-3'
<i>Gpx</i> (GPx)	5'-TGCAATCAGTTCGGACATC-3'	5'-CACCTCGCACTTCTCAAACA-3'
<i>Ho1</i> (HO1)	5'-AGCCCCACCAAGTTCAAACA-3'	5'-CATCACCTGCAGCTCCTCAA-3'
<i>Nrf2</i> (NRF2)	5'-CTACTCCCAGGTTGCCACA-3'	5'-CGACTCATGGTCATCTACAAATGG-3'
<i>p53</i> (p53)	5'-CCGTGTTGGTTCATCCCTGTA-3'	5'-TTTTGGATTTTAAAGACAGAGTC-3'
<i>Ppara</i> (PPARα)	5'-TGTTTGTGGCTGCTATAATT-3'	5'-GCAACTTCTCAATGTAGCCTA-3'
<i>Pparγ</i> (PPARγ)	5'-GTGCCAGTTTGCATCCGTAGA-3'	5'-GGCCAGCATCGTGTAGATGA-3'
<i>Pgc1α</i> (PGC1α)	5'-ATGTGTCGCCTTCTGTCT-3'	5'-ATCTACTGCCTGGGGACCTT-3'
<i>Sirt1</i> (SIRT1)	5'-TTGTGAAGCTGTTCTGTGGAG-3'	5'-GGCGTGGAGGTTTTTCAGTA-3'
<i>Sod-Cu/Zn</i> (SOD-Cu/Zn)	5'-GGTGGTCCACGAGAAACAAG-3'	5'-CAATCACACCACAAGCCAAG-3'
<i>Sod-Mn</i> (SOD-Mn)	5'-AAGGAGCAAGGTCGCTTACA-3'	5'-ACACATCAATCCCAGCAGT-3'

**Tabla 6. Oligonucleótidos empleados en los ensayos de expresión por qRT-PCR (SYBR Green® ASSAY).**

Para ello, se utilizó, o bien SYBR Green Master (Applied Biosystems) y los oligonucleótidos listados en la **Tabla 6**, o bien Taqman Master (Roche) con los ensayos Taqman específicos (**Tabla 7**).

La PCR fue desarrollada por el sistema PCR Fast a Tiempo Real 7300HT (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación constaron de un primer ciclo a 50 °C durante 2 minutos, un segundo ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos, seguido de



40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos e hibridación y síntesis a 60 °C durante 1 minuto.

Gen (Nombre de la proteína)	Código de identificación (Taqman® Assay)
ARNr 18S (18S)	Hs99999901_s1
Glp1r (GLP1R)	Mm 00445292_m1
Pask (PASK)	Mm00435916_m1

**Tabla 7. Ensayos Taqman® (oligonucleótidos y sondas) empleados en los ensayos de expresión por qRT-PCR (TAQMAN® ASSAY)**

Los datos fueron analizados con el Software System 7300 (Applied Biosystems). Los resultados fueron normalizados por el gen de la *β-Actina* y el ARNr 18S.

En los ensayos Taqman se analizaron los cambios relativos en la cantidad de transcritos, usando como patrón el transcrito de referencia ARNr 18S, y calculándose mediante el método de comparación de Ct (**Figura 14**).

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

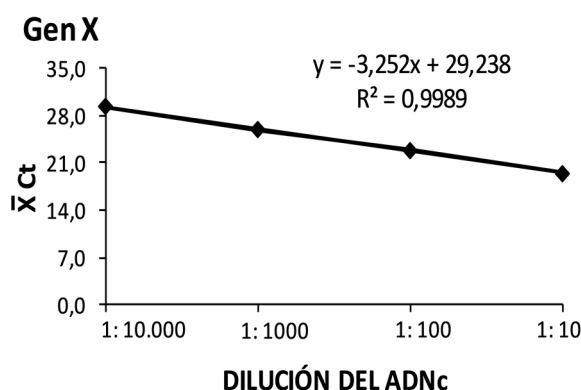
donde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_1 - \Delta Ct_2$

siendo  $\Delta Ct_1 = Ct_{\text{gen problema}} - Ct_{\text{gen referencia}}$  de la muestra nº1

$\Delta Ct_2 = Ct_{\text{gen problema}} - Ct_{\text{gen referencia}}$  de la muestra nº2

**Figura 14. Método de cálculo de expresión génica  $\Delta\Delta Ct$ , utilizado en los ensayos Taqman.**

En el caso de los ensayos por SYBR Green, los datos obtenidos fueron extrapolados en una recta estándar, construida a partir de diluciones seriadas de un ADNc de las muestras (**Figura 15**). Extrapolando en esa recta se comprobó la eficiencia de amplificación y la validación de la qRT-PCR, proporcionando más fiabilidad a los resultados obtenidos.



**Figura 15. Ejemplo representativo del método de cálculo para los ensayos por SYBR Green.**

### 3.2.7. Análisis de expresión de miARNs

#### 3.2.7.1. Extracción y medida de la concentración del ARN

Para el estudio de los miARNs, se extrajo el ARN de hígado de los ratones, utilizando columnas “*Rneasy mini*” y siguiendo las instrucciones del protocolo del kit de extracción “*miRNeasy MiniKit*” (Qiagen).

Previamente, los hígados fueron homogenizados en “*Quiazol Lysis*”, con la ayuda de bolas metálicas (Bio-Rad). A continuación, se añadieron 140  $\mu$ L de cloroformo, se agitaron durante 15 segundos y se centrifugaron a máxima velocidad, durante 15 minutos, a 4 °C. La fase acuosa se retiró a una columna “*Rneasy mini*” y se añadieron 525  $\mu$ L de etanol puro. Las muestras se centrifugaron a máxima velocidad durante 30 segundos, a temperatura ambiente. Se hicieron varios lavados añadiendo 700  $\mu$ L de “*Buffer RWT*” y se centrifugaron durante 30 segundos. Por último, se incorporaron 500  $\mu$ L de “*Buffer RPE*” y se hizo una última centrifugación de 2 minutos para secar completamente la membrana de la columna. Se colocaron las columnas en un nuevo tubo de 1,5 mL y el ARN obtenido se disolvió en 30  $\mu$ L de agua libre de ribonucleasas.

A continuación, se midió la concentración y la pureza del ARN, a través del Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

#### *3.2.7.2. Síntesis del ADNc: Transcripción Reversa*

El ARN extraído fue diluido a una concentración de 5 ng/ $\mu$ L y se retrotranscribió a ADNc usando el kit “*cDNA Synthesis II*” (Exiqon), en un volumen final de 10  $\mu$ L. La retrotranscripción fue realizada en el termociclador CFX96 (Bio-Rad), donde la mezcla de reacción se incubó a 25 °C durante 5 minutos, posteriormente a 42 °C durante 30 minutos y finalmente a 85 °C durante 5 minutos.

#### *3.2.7.3. PCR a tiempo real (SYBR Green ® Assay)*

Para analizar la expresión de los miARNs se llevó a cabo una PCR a tiempo a real, utilizando la Master Mix SYBR Green (Bio-Rad), el oligonucleótido específico para el miARN (LNA™ PCR primer set, Exiqon) y una placa de 96 pocillos (Bio-Rad) (**Tabla 8**).

El ADNc fue diluido 1:80 y el volumen final de la reacción fue de 10  $\mu$ L. La PCR estuvo basada en la tecnología SYBR Green (Bio-Rad) y se realizó en el termociclador CFX96 (Bio-Rad). Las condiciones de amplificación constaron de un primer ciclo a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 10 segundos e hibridación y síntesis a 60 °C durante 1 minuto.

Los resultados fueron analizados por la ecuación de la variación de Ct (**Figura 14**), y normalizados por el ARN ribosomal 5S.

<b>Nombre del miARN</b>	<b>Secuencia diana</b>
mmu-miR-433-3p	5'-AUCAUGAUGGGCUCCUCGGUGU-3'

**Tabla 8. Oligonucleótido específico del miR-433 en los ensayos de expresión por qRT-PCR (SYBR Green ®ASSAY).**

### 3.2.8. Cuantificación del ADN mitocondrial por qRT-PCR

Se extrajo el ADN total mediante el uso de resina CHELEX 100 (Bio-Rad) al 10 %. Para ello, el tejido fue homogenizado y digerido en 15 µL de Proteinasa K (10 mg/mL), a 55 °C, en agitación continua durante 1 hora. La reacción se paró a 100 °C, durante 15 minutos, para desnaturalizar completamente las proteínas, y se centrifugó a 18.000 x g durante 10 minutos, a 4 °C. El sobrenadante (ADN) fue retirado a otro tubo para ser utilizado en la qRT-PCR.

La PCR cuantitativa a tiempo real fue llevada a cabo utilizando la tecnología SYBR Green (Applied Biosystems), una placa de 96 pocillos (Roche Diagnostics) y una pareja de oligonucleótidos específicos mitocondriales (ARNr 12S) y otros nucleares ( $\beta$ -Actina) (**Tabla 6**).

Previamente, se realizaron curvas estándares basadas en diluciones seriadas del ADN total de una de las muestras. La PCR fue desarrollada por el sistema PCR Fast a Tiempo Real 7300HT (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación constaron de un primer ciclo a 50 °C durante 2 minutos, un segundo ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos e hibridación y síntesis a 60 °C durante 1 minuto.

Los datos fueron analizados con el Software System 7300 (Applied Biosystems). Los resultados fueron calculados, a través del ratio entre el ADN mitocondrial y el ADN nuclear.

### 3.2.9. Inmunohistoquímica

Para determinar la presencia y la localización de una determinada proteína en tejido, se llevó a cabo una inmunohistoquímica. Esta técnica está fundamentada en la reacción Antígeno-Anticuerpo, donde el anticuerpo tiene la capacidad de unirse específicamente al

antígeno que se desea detectar. Esta reacción puede ser visualizada mediante el uso de anticuerpos que estén marcados con fluorocromos (Theodosiou et al., 2007).

Para ello, se cortaron rodajas de 20  $\mu\text{m}$  de grosor de los hígados de los ratones con la ayuda de un criostato (LEICA CM1510-S, Leica Biosystems). A continuación, las secciones cortadas fueron fijadas durante 15 minutos, a 4 °C en Paraformaldehído al 4 %, y lavadas 2 veces con PBS 1X, a temperatura ambiente. Después, fueron permeabilizadas durante 10 minutos con PBS; 0,4 % de Tritón X-100, y tras 3 lavados con PBS 1X, se incubaron con una solución de bloqueo para evitar las interacciones no específicas del anticuerpo (PBS-10 % FBS; 0,1 % de Tritón X-100) durante 1 hora. Después, se incubaron con el anticuerpo anti-SIRT-1 diluido 1:100 en la solución de bloqueo durante toda la noche, a 4 °C. Posteriormente, fueron lavados durante 30 minutos con PBS e incubados con el anticuerpo secundario que fue anti Ig G de conejo unido al fluoróforo Alexa 488 (GeneTex, Inc., San Antonio, CA, EEUU) diluido 1:200 en solución de bloqueo, durante 1 hora, a temperatura ambiente. El ADN del núcleo fue marcado añadiendo 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de 4',6-diamidina-2-fenilindol (DAPI) en PBS.

Finalmente, las secciones de tejido del portaobjetos fueron selladas con Fluoromont-G (EMS, Hatfield, PA, EEUU) y cubiertas con el cubreobjetos. Las imágenes fueron tomadas con un sistema de microscopía láser confocal TCS SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), equipado con un microscopio Leica invertido DMIRE2, usando un objetivo HCX PL APO 63x/1,4-0,6 Oil Lbd BI de inmersión de aceite, en el Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid.

Las imágenes de fluorescencia confocal se realizaron con una cámara de fotos (Roope Scientific Photometrics) y analizadas mediante el software ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EEUU).

## **4. OTRAS TÉCNICAS**

### **4.1. Visualización *in vivo* de mitocondrias de las células MEFs (®MitoTracker)**

Las mitocondrias de los MEFs, tanto de tipo WT como *Pask<sup>-/-</sup>*, fueron visualizadas al microscopio de fluorescencia. Para ello, fueron teñidas con la solución MitoTracker rojo. Es un colorante fluorescente con afinidad por los grupos tioles de las mitocondrias de las células vivas.

Para ello, los MEFs fueron sembrados sobre un cubreobjetos de cristal circular colocado previamente en el fondo de los pocillos de una placa, que contenía medio DMEM completo (Lonza). Después, el medio fue eliminado y las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X. A continuación, se las estimuló durante 1 hora con medio DMEM (Gibco), suplementado con glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 mg/mL) y glucosa a una concentración de 2,5 ó 20 mM, según correspondiese. A continuación, el medio fue eliminado completamente, y se añadieron 350 µL de solución MitoTracker rojo 1 mM (Invitrogen). Se esperó 45 minutos para que el MitoTracker se introdujera en las mitocondrias. El cubreobjetos fue lavado con PBS 1X y montado en un portaobjetos para observarlo al microscopio de fluorescencia (Leica DMRP). Las fotos fueron tomadas con la cámara Leica (Roope Scientific Photometrics).

### **4.2. Visualización de mitocondrias hepáticas al microscopio electrónico de transmisión (MET)**

Las mitocondrias de los hepatocitos de ratón fueron visualizadas al microscopio electrónico de transmisión.

Para ello, una vez sacrificado el ratón, se cortó un trozo pequeño y fino (~20 mg) de hígado. A continuación, se fijó en Paraformaldehído al 4 % y Glutaraldehído al 2,5 %, y

disueltos en un tampón fosfato (2,26 % de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 2,52 % de  $\text{NaOH}$ ; pH 7,4), durante 5 horas, a 4 °C. Tras ello, fue lavado 3 veces en el tampón fosfato, durante 10 minutos y se dejó en dicho tampón durante toda la noche, a 4 °C.

Después, se incubó en tetróxido de osmio al 1 % diluido en agua bidestilada, durante 1 hora, a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados de 10 minutos con agua bidestilada. A continuación, el tejido fue deshidratado en concentraciones crecientes de acetona (30 % - 50 % - 70 % - 80 % - 90 % - 95 % - 100 %) cada 15 minutos. Posteriormente, se infiltró en concentraciones crecientes de resina Spurr (Sigma) - acetona (1:3, 1:1, 3:1) cada hora, y se dejó en resina pura durante toda la noche. Finalmente, se realizaron pequeños bloques y se dejaron polimerizar en la estufa a 70 °C, durante 48 horas.

Los cortes se visualizaron al microscopio electrónico JEOL JEM 1010, del Centro de Citometría y Microscopia de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid.

### **4.3. Determinación del contenido de ATP**

#### **4.3.1 Medida del contenido del ATP celular en MEFs**

La concentración total del ATP celular fue medida mediante el ensayo de la luciferasa. El ensayo de bioluminiscencia está basado en la reacción de ATP con la luciferasa (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) y su sustrato la luciferina (Sigma).

Los MEFs fueron cultivados en una placa de 12 pocillos con medio DMEM completo (Lonza), a 37 °C y con 5 % de  $\text{CO}_2$ . Las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X, y fueron tratadas con diferentes concentraciones de glucosa (2,5 ó 20 mM) durante 2 horas. En algunos casos, las células no fueron tratadas, considerándose como controles (CULTIVO STD). Después, las células fueron tripsinizadas, y resuspendidas en 1.500  $\mu\text{L}$  de PBS, de los cuales 50  $\mu\text{L}$  fueron centrifugados a 18.000 x g durante 5 minutos para recoger el pellet.

A continuación, se añadió a los pellets, 20 µL de ácido perclórico 1,35 M para realizar una precipitación ácida de las proteínas. Se centrifugaron a 18.000 x g durante 30 segundos, a 4 °C y se neutralizaron con 15 µL de KHCO<sub>3</sub> 2,8 M - Tris 0,1 M. Tras una centrifugación de 60 segundos, se utilizaron 10 µL del sobrenadante para la reacción de la luciferasa, añadiéndose 10 µL de luciferasa y 100 µL de luciferina. La luminiscencia fue determinada mediante un luminómetro (luminómetro BG-P; GEM Biomedical, Hamden, CT).

#### 4.3.2. Medida del contenido del ATP hepático

En el caso de los hígados, la concentración total de ATP fue medida de forma similar a los MEFs.

Se cortaron pequeños trozos de hígado que fueron homogenizados en Tris-HCl 50 mM - KCl 100 mM; pH 7,4. A continuación, se centrifugaron a 12.000 x g, durante 1 minuto, para eliminar posibles restos orgánicos, utilizándose 50 µL para medir el ATP.

Los resultados fueron extrapolados en una recta estándar construida a partir de diluciones seriadas del reactivo ATP (Adenosín trifosfato, 1 mg) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EEUU).

### **4.4. Determinación del contenido de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

#### 4.4.1. Medida del contenido de ROS en MEFs

La producción de especies reactivas de oxígeno fue medida a través del uso de fluoresceína, un reactivo fluorescente que es capaz de penetrar en las células detectando la generación de productos oxidantes (Jakubowski and Bartosz, 2000).

Las células fueron sembradas en medio DMEM completo (Lonza) en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 100 µL del reactivo 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato



(H<sub>2</sub>DCFDA) (Molecular Probes/ Invitrogen Life Technologies) 40  $\mu$ M y se esperó 1 hora. Después, las células fueron lavadas en PBS 1X y tratadas, según correspondiese.

La medición se llevó a cabo en un lector de placas de fluorescencia (Thermo Fisher Scientific) a una longitud de onda de 480 nm de excitación y 530 nm de emisión. Los resultados se normalizaron con la medida del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio).

El MTT es un compuesto soluble en agua y de color amarillo y que al reducirse mediante un disolvente orgánico como el DMSO (dimetilsulfóxido) se convierte en un compuesto perteneciente a la familia de los formazanos, de color violeta e insoluble en agua. Cabe destacar que la acción del MTT es debida principalmente a las enzimas deshidrogenasas presentes en las mitocondrias, donde se produce la mayor actividad metabólica de la célula, por ello este reactivo es utilizado en ensayos de viabilidad celular (Berridge et al., 2005).

Para ello, las células fueron lavadas en PBS 1X y se incubaron con 50  $\mu$ L de MTT (1 mg/mL) durante 1 hora. Después, el MTT fue eliminado y se añadieron 100  $\mu$ L de DMSO (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EEUU), para que los cristales de MTT originados se disolviesen y pudiese ser medido. Los resultados fueron medidos en un lector de placas (Thermo Fisher Scientific) a una longitud de onda de 570 nm.

#### 4.4.2. Medida del contenido de ROS/RNS hepático

Los niveles de especies reactivas, tanto de oxígeno como de nitrógeno, fueron medidos a través de un ensayo de fluorescencia donde se utilizó el DCFH-DiOxyQ, una sonda fluorescente que reconoce a las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), siendo químicamente similar al 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato. Así, la intensidad

de fluorescencia es directamente proporcional a los niveles totales de ROS/RNS (Biolabs, 2017).

La presencia de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en hígado de ratón se determinó mediante un ensayo *in vitro* y siguiendo las instrucciones del protocolo del kit “OxiSelect *in vitro* ROS/RNS Assay Kit Green Fluorescence” (Cell Biolabs, INC.). La medición se llevó a cabo en un lector de placas mediante detección de fluorescencia (Thermo Fisher Scientific) a una longitud de onda de 480 nm de excitación y 530 nm de emisión. Los resultados fueron extrapolados en una recta patrón construida con concentraciones conocidas de DCF (2',7'-diclorodihidrofluoresceína, 1 mM).

## **5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos que aparecen en los gráficos de esta tesis doctoral están representados como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism Software versión 6.

Para estudiar las diferencias que había entre las medias de 2 grupos, se utilizó la prueba paramétrica *t* de Student de 2 colas no apareadas, donde se compararon las medias de 2 grupos diferentes con una única condición experimental, de distribución normal y tamaño muestral pequeño. Para analizar las diferencias que había entre varios grupos que fueron expuestos a más de una condición experimental, se utilizó el Análisis de la Varianza (ANOVA) de dos vías, seguido de comparaciones dos a dos con el test *post-hoc* de Turkey. Se consideró un valor *p* inferior a 0,05 como estadísticamente significativo.



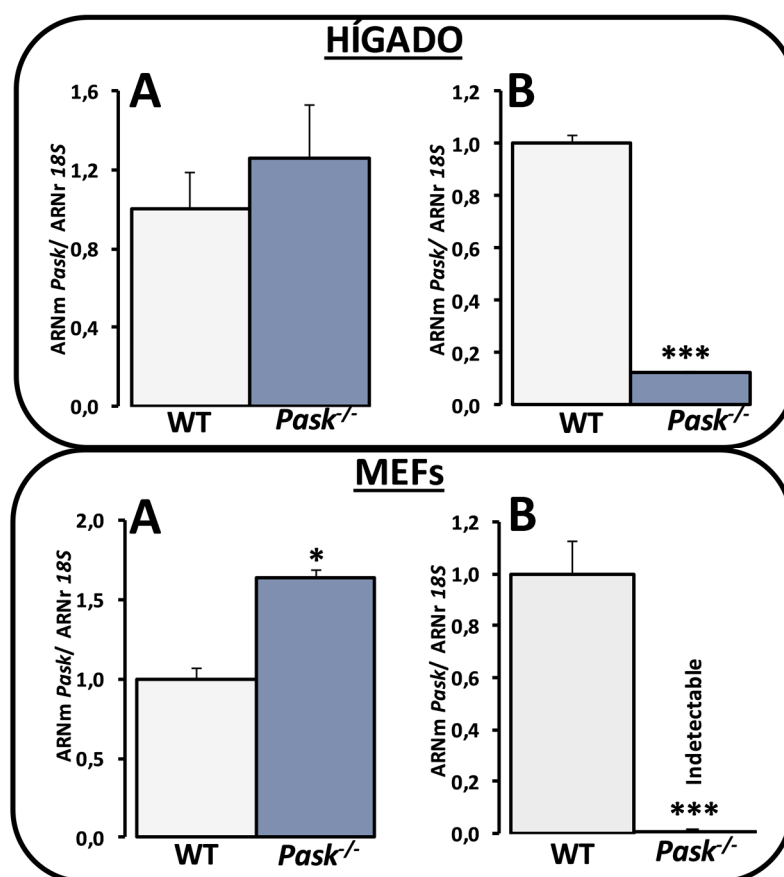




## 1. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE PASK SOBRE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL, LA GENERACIÓN DE ROS Y LOS MECANISMOS ANTIOXIDANTES Y DE SUPERVIVENCIA CELULAR

### 1.1. La expresión del ARNm codificante para la proteína PASK funcional está bloqueada en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup>

Con el objetivo de comprobar el genotipo de los ratones, la expresión del ARNm de *Pask* fue analizada en hígados y fibroblastos embrionarios (MEFs) de ratones de tipo WT y *Pask*<sup>-/-</sup>.



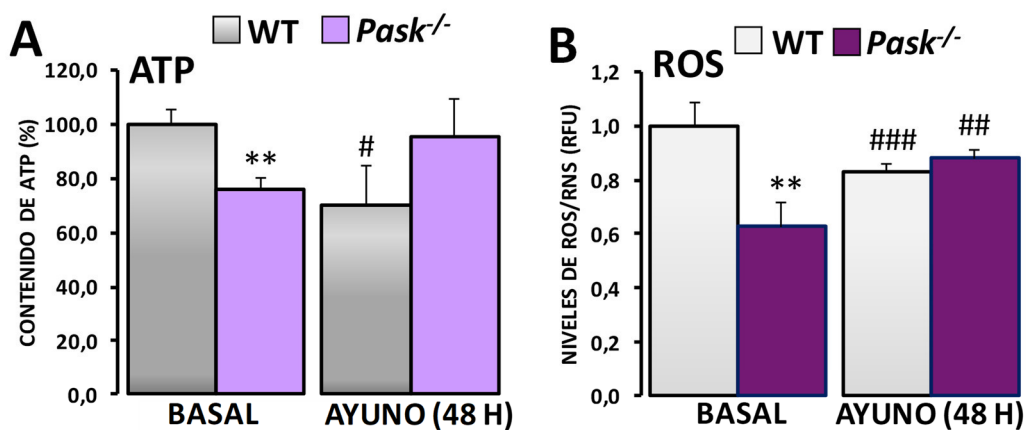
**Figura 16. Expresión de PASK en hígado y fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs).**

Niveles del ARNm de *Pask* con la sonda que hibrida en la región comprendida entre los exones 7 y 8 del gen *Pask*<sup>-/-</sup> (A) y con la sonda específica para el dominio serina/treonina quinasa (B) (ausente en los *Pask*<sup>-/-</sup>), en hígado de ratón en condición basal y en fibroblastos embrionarios de ratón, de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>). Las barras de los gráficos representan las medias  $\pm$  SEM de los valores obtenidos en la PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) en hígado y MEFs, con respecto a los valores del ARNr 18S, utilizado como gen control; n= 4-5 animales por condición en hígado; n= 3-4 experimentos independientes realizados por duplicado en MEFs. \**P*<0,05, \*\*\**P*<0,001 WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>.

Para ello, se realizó qRT-PCR, empleándose 2 sondas diferentes: una que hibrida en la región comprendida entre los exones 7 y 8 del gen *Pask* y otra específica de la secuencia que codifica para el dominio serina/treonina quinasa (ausente en los *Pask*<sup>-/-</sup>). Los ratones *Pask*<sup>-/-</sup>, al igual que los WT, expresan normalmente el ARNm que dará lugar a la proteína PASK (**Figura 16A**), sin embargo en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> este ARNm no contiene la secuencia que codifica para el dominio quinasa (**Figura 16B**), por tanto dará lugar a una proteína no funcional.

### 1.2. La producción de ATP y ROS en hígado disminuye en los ratones deficientes en PASK en condición basal, y permanece inalterada en ayuno

La fosforilación oxidativa mitocondrial es la principal vía de síntesis de ATP, siendo directamente proporcional a la disponibilidad de nutrientes en el organismo. En este proceso, como consecuencia de la reducción incompleta del oxígeno, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS).



**Figura 17. Efectos de la deficiencia de PASK en el contenido hepático de ATP y ROS/RNS.**

(A) El contenido de ATP y (B) los niveles de ROS/RNS fueron medidos en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 48 horas (AYUNO 48 H), en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>). Los valores de ATP y ROS obtenidos en los ratones WT en condición basal fueron considerados como 100 % ó 1, respectivamente. Las barras de los gráficos representan las medias  $\pm$  SEM; n= 4-5 animales por condición. \*\*,  $P < 0,01$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; #,  $P < 0,05$ , ##,  $P < 0,01$ , ###,  $P < 0,001$  BASAL vs. AYUNO 48 H.

Los niveles de ATP y ROS (ROS/ RNS) fueron medidos en hígado de ratón de tipo WT y *Pask*<sup>-/-</sup>, en condiciones basales (no ayunados) y ayunados durante 48 horas.

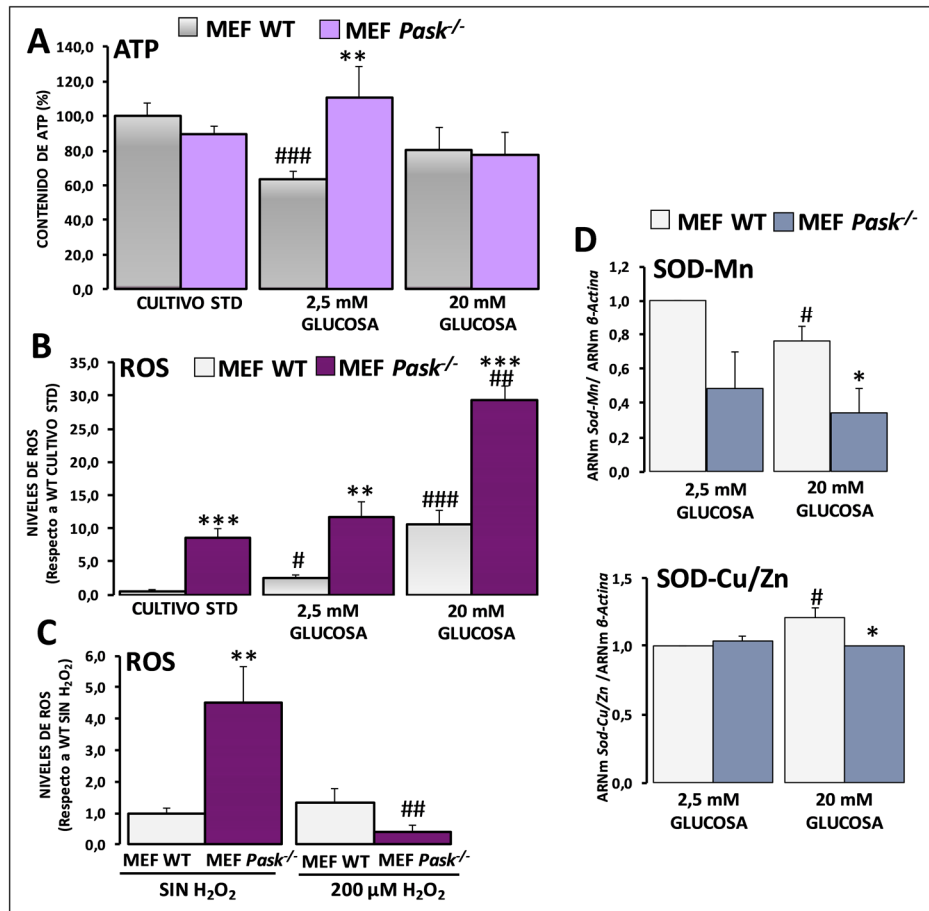
Los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> mostraron menor contenido de ATP y ROS (**Figura 17A, B**), en situación basal. En cambio, en respuesta al ayuno prolongado de 48 horas, la producción de ATP y ROS estaba limitada en los WT, mientras que los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> seguían manteniendo o incluso aumentando los niveles de ATP y ROS, respecto a situación basal (**Figura 17A, B**). Es decir, el ayuno (privación de nutrientes) no inhibía la producción de ATP y ROS en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup>, como ocurría de forma lógica en WT.

### **1.3. La deficiencia de PASK en MEFs potencia la producción de ROS, pero mejora la respuesta protectora frente al estrés oxidativo**

Inicialmente, se analizaron los niveles de ATP y ROS, y la expresión del ARNm de *Sod-Mn* y *Sod-Cu/Zn*, en MEFs de tipo WT y *Pask*<sup>-/-</sup>, cultivados en condiciones estándar (25 mM de glucosa) (CULTIVO STD) o bien a baja glucosa (2,5 mM) durante 2 horas y posteriormente tratadas otras 2 horas con distintas concentraciones de glucosa (2,5 ó 20 mM).

Nuestros resultados indicaron que en los MEFs WT la producción de ATP dependía de la disponibilidad de glucosa. Así, las células que crecieron en un medio con baja concentración de glucosa durante 4 horas disminuyeron la generación de ATP y aumentaron la producción de ROS (**Figura 18A, B**). Sin embargo, las células deficientes en PASK mantuvieron activa la producción de ATP, a pesar de las condiciones de baja glucosa, y produjeron mayor cantidad de ROS, en cualquiera de las condiciones descritas anteriormente (**Figura 18A, B**). Esto indicó que las células deficientes en PASK presentaban un metabolismo oxidativo mitocondrial activo, siendo independiente de la disponibilidad de nutrientes.





**Figura 18. Efectos de la deficiencia de PASK en el contenido intracelular de ATP, ROS, y los niveles de expresión de enzimas antioxidantes, en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs).**

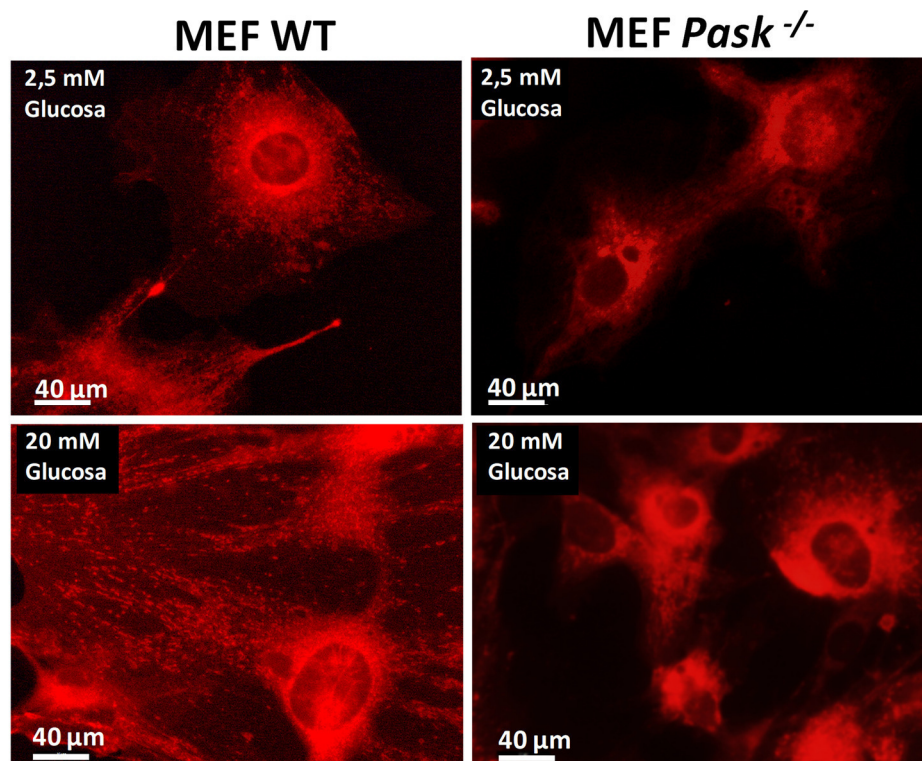
(A) El contenido de ATP (B, C) los niveles de ROS y (D) los niveles del ARNm de las enzimas antioxidantes, la superóxido dismutasa manganeso (SOD-Mn) y cobre/zinc (SOD-Cu/Zn) fueron medidos en condiciones de cultivo estándar (CULTIVO STD), a baja (2,5 mM) y a alta (20 mM) concentración de glucosa, en MEFs de tipo silvestres (WT) y deficientes en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>). Las células fueron tratadas o no con 2,5 mM de glucosa durante 2 horas y después a 2,5 ó 20 mM de glucosa durante otras 2 horas (A, B, D) y en otros casos (C) se añadieron 200 μM de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 2 horas. Los niveles de expresión fueron normalizados por el ARNm de la β-Actina, utilizado como gen control. (A, B) los valores de ATP y ROS obtenidos en MEF WT CULTIVO STD fueron considerados como 100 % ó 1, respectivamente, (C) los valores de ROS obtenidos en MEF WT SIN H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y (D) los niveles de expresión de enzimas antioxidantes obtenidos en MEF WT 2,5 mM GLUCOSA, fueron considerados como 1. Las barras de los gráficos representan las medias ± SEM; n= 3-4 experimentos realizados en duplicado. \*, *P*<0,05, \*\*, *P*<0,01, \*\*\*, *P*<0,001 MEF WT vs. MEF *Pask*<sup>-/-</sup>; #, *P*<0,05, ##, *P*<0,01, ###, *P*<0,001 CULTIVO STD vs. 2,5 mM, 20 mM GLUCOSA; 2,5 mM GLUCOSA vs. 20 mM GLUCOSA.

Además, los MEFs deficientes en PASK mostraron menor expresión génica de *Sod-Mn* y *Sod-Cu/Zn* (Figura 18D). Sin embargo, tras estimular a las células con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), a una concentración elevada (200 μM), la producción de ROS quedó

bloqueada en las células deficientes en PASK (**Figura 18C**). Por tanto, estos datos indicaban que los MEFs *Pask*<sup>-/-</sup> respondían mejor ante una situación de estrés, controlando la producción de ROS.

#### 1.4. Las mitocondrias de los MEFs deficientes en PASK muestran una dinámica alterada

Las mitocondrias de MEFs de tipo WT y *Pask*<sup>-/-</sup> fueron visualizadas *in vivo*, mediante la solución MitoTracker rojo, cultivados en un medio de cultivo a baja (2,5 mM) y a alta (20 mM) concentración de glucosa.



**Figura 19. Efectos de la glucosa y la deficiencia de PASK en la localización de las mitocondrias en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs).**

Comparación de mitocondrias (visualizadas *in vivo*) en MEFs de tipo silvestres (WT) y deficientes en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>), a diferentes concentraciones de glucosa (2,5 y 20 mM). Las células fueron tratadas durante 1 hora con medio que contenía o 2,5 ó 20 mM de glucosa. Después fueron teñidas con el MitoTracker Rojo 1 mM. Las mitocondrias fueron visualizadas en color rojo. Se tomaron fotografías con el microscopio de fluorescencia (Leica DMRP) a un aumento de 40x.

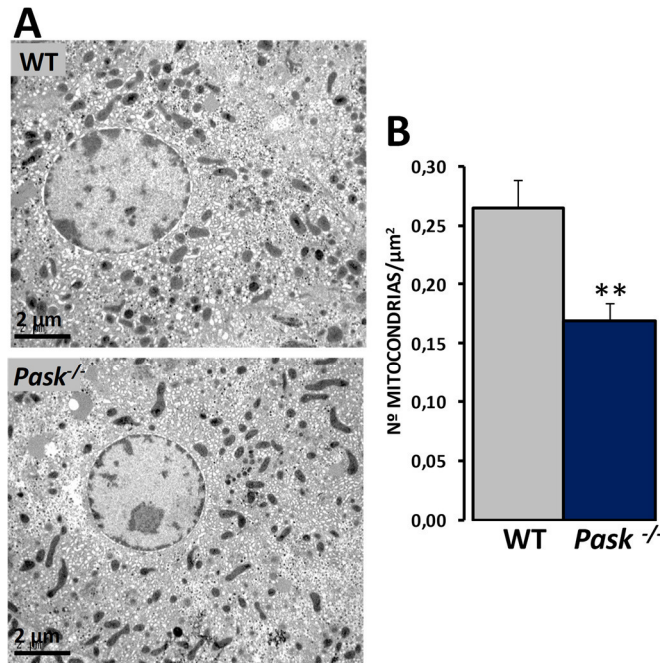
El marcaje con MitoTracker indicó que las mitocondrias de MEFs WT manifestaron ser más dinámicas, trasladándose desde la periferia del núcleo a regiones citoplasmáticas más alejadas, cuando la glucosa aumentaba. Sin embargo, las mitocondrias de las células *Pask*<sup>-/-</sup> tendieron a acumularse mayoritariamente en la periferia del núcleo (**Figura 19**).

### **1.5. Los hepatocitos de los ratones deficientes en PASK muestran menor número de mitocondrias y alteraciones morfológicas**

La mitocondria es el principal orgánulo productor de especies reactivas de oxígeno durante los procesos del metabolismo oxidativo para la producción final de energía, en forma de ATP.

El elevado contenido de ATP, en condiciones de ayuno, en hígado y en MEFs deficientes en PASK, y el menor en condiciones basales en hígado (disminuye un  $36,00 \pm 9,00$  %), podría deberse a cambios en la actividad mitocondrial, que muy probablemente se podría atribuir al aumento/disminución del contenido mitocondrial. Por ello, se empleó la microscopía electrónica de transmisión para visualizar las mitocondrias de los hepatocitos de WT y *Pask*<sup>-/-</sup>. El número medio de mitocondrias fue cuantificado en 7 hepatocitos distintos y corregido por el área total en cada micrografía.

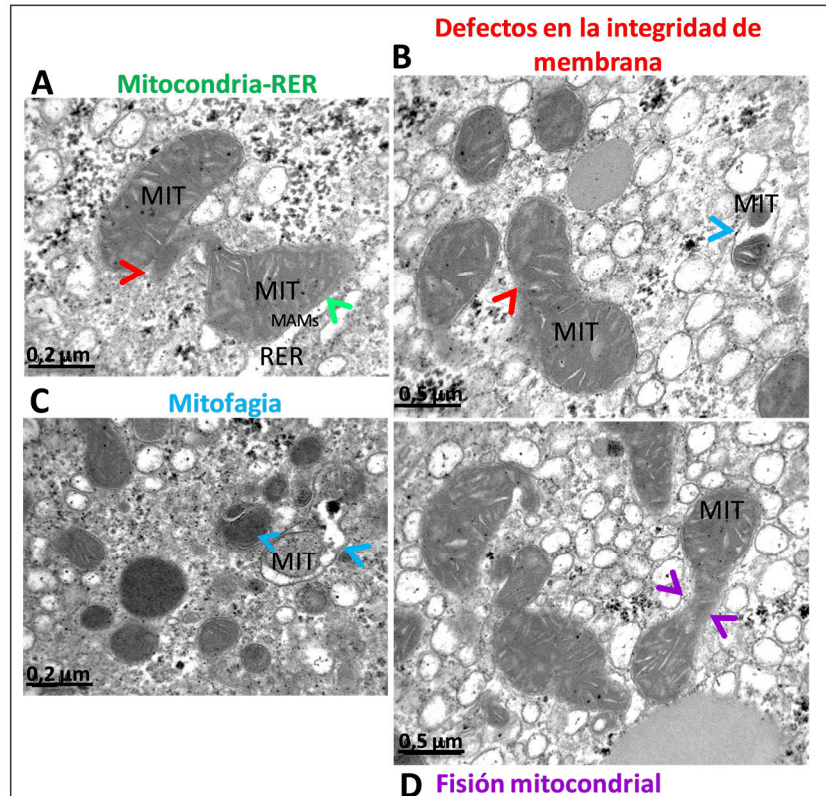
Los ratones deficientes en PASK mostraron un  $36,47 \pm 5,28$  % menos mitocondrias que WT (**Figura 20B**). Además, las mitocondrias parecieron ser de menor tamaño y su morfología más bien redondeada (**Figura 20A**).



**Figura 20. Efectos de la deficiencia de PASK en la morfología, el tamaño y el número de mitocondrias hepáticas.**

(A) Micrografías representativas de mitocondrias hepáticas (B) número medio de mitocondrias hepáticas de ratones de tipo silvestres (WT) y deficientes en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>). Las mitocondrias hepáticas fueron visualizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), empleando el microscopio JEOL JEM 1010. Las barras del gráfico representan el número medio de mitocondrias cuantificadas en 7 hepatocitos distintos y corregido por el área total (μm<sup>2</sup>) en cada micrografía. \*\*, *P* < 0,01 WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>.

Asimismo, los hepatocitos deficientes en PASK presentaron múltiples asociaciones entre la membrana externa mitocondrial y el retículo endoplasmático rugoso (RER) denominadas MAMs (*Mitochondria-associated ER membranes*) (**Figura 21A**) y alta presencia de Ca<sup>2+</sup> en la matriz mitocondrial, pues se ha visto que estas conexiones (mitocondrias-RER) son primordiales en la homeostasis del Ca<sup>2+</sup>. También, observamos múltiples mitofagias, fisiones y defectos en la integridad de las membranas mitocondriales (**Figura 21A, B, C, D**), estando en relación con el Ca<sup>2+</sup>, pues éste es un importante regulador de las fisiones mitocondriales (Marchi et al., 2014).



**Figura 21. Micrografías representativas de mitocondrias hepáticas de ratones deficientes en PASK.**

Las mitocondrias hepáticas (A, B, C, D) de ratones deficientes en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 meses de edad, se visualizaron mediante microscopía electrónica de transmisión. Las flechas *rojas* señalan defectos en la integridad de las membranas mitocondriales, las *verdes* indican conexiones entre la mitocondria y el retículo endoplasmático rugoso (RER), las *azules* muestran un tipo de autofagia selectiva por el que se degradan y reciclan específicamente las mitocondrias (mitofagias) y las *moradas* indican fisiones mitocondriales (divisiones).

MIT: mitocondria; RER: retículo endoplasmático rugoso; MAMs: *Mitochondria-associated ER membranes*.

### 1.6. La deficiencia de PASK estimula la expresión de varios genes hepáticos implicados en la biogénesis mitocondrial y eleva el contenido de ADN mitocondrial

La adaptación a estados de ayuno prolongado puede requerir la activación de procesos que estén controlados a nivel transcripcional por factores de transcripción como los NRFs o PPARs. La actividad de estos factores de transcripción está modulada por coactivadores transcripcionales que coordinan la expresión de los diferentes componentes

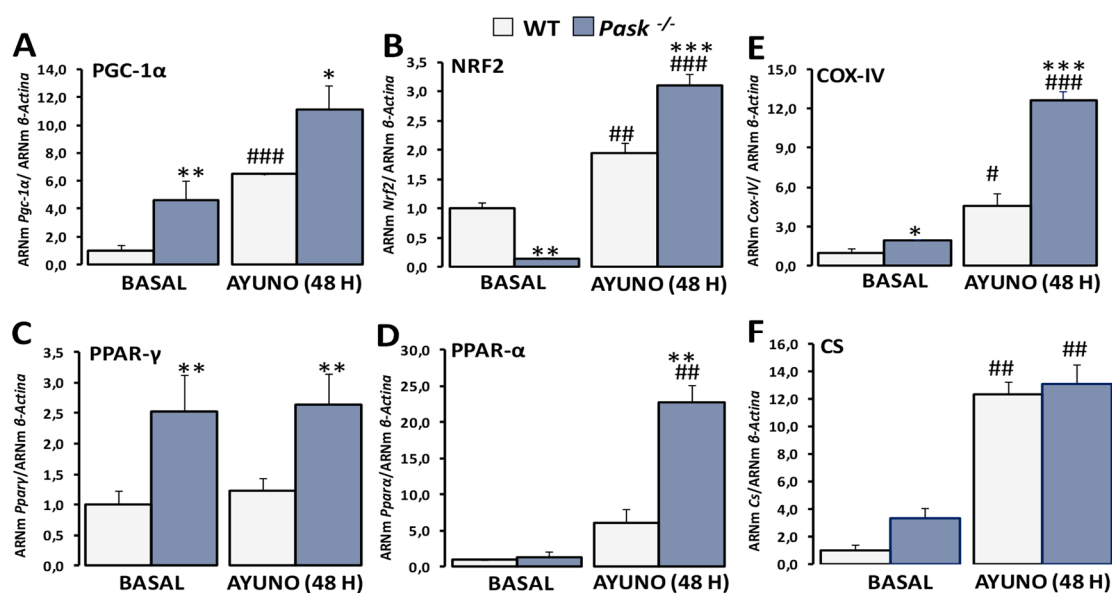
fundamentales en la producción de ATP. Es el caso de PGC-1 $\alpha$ , el principal regulador del metabolismo oxidativo y de la biogénesis mitocondrial.

De este modo, se analizó la expresión del ARNm del coactivador PGC-1 $\alpha$  y de algunos factores de transcripción que participan en la regulación de la función mitocondrial como NRF2, PPAR- $\gamma$  y PPAR- $\alpha$ . También, se evaluó el contenido mitocondrial en hígado de ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup>. Para ello, se determinó el número de copias de ADN mitocondrial, medido como el ratio existente entre el genoma mitocondrial y el nuclear; y además se estudió la expresión de algunos componentes responsables de la función mitocondrial como la enzima citrato sintasa (CS), que participa en el ciclo de Krebs, y algunos componentes de la cadena de transporte electrónico como la citocromo c oxidasa, subunidad IV (COX-IV).

El ayuno de 48 horas aumentó el contenido de ADN mitocondrial (ADNmt) en los ratones WT. Además, fue más elevado en los ratones deficientes en PASK, en cualquiera de las condiciones analizadas (basal (9,31  $\pm$  1,25 vs. 3,81  $\pm$  0,03), ayuno (10,30  $\pm$  1,40 vs. 5,34  $\pm$  0,14)), respecto a WT.

Por otra parte, el ayuno prolongado (48 horas) aumentó la expresión génica de *Pgc-1 $\alpha$* , *Nrf2* y *Cox-IV* (**Figura 22A, B, E**). Asimismo, la expresión del ARNm de *Pgc-1 $\alpha$* , *Nrf2*, *Ppar- $\gamma$* , *Ppar- $\alpha$*  y *Cox-IV* fue significativamente mayor en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup>, con respecto a WT (**Figura 22A, B, C, D, E**). En cambio, en estado basal, *Pask*<sup>-/-</sup> mostró mayor expresión génica de *Pgc-1 $\alpha$* , *Ppar- $\gamma$*  y *Cox-IV* (**Figura 22A, C, E**), pero no de *Nrf2*, siendo ~7 veces menor, con respecto a WT (**Figura 22B**). Además, en condición basal, la expresión del ARNm de *Cs* fue ligeramente mayor en *Pask*<sup>-/-</sup>, y el ayuno la aumentó considerablemente, pero al contrario que los anteriores, no se observaron diferencias significativas entre WT y *Pask*<sup>-/-</sup> (**Figura 22F**).





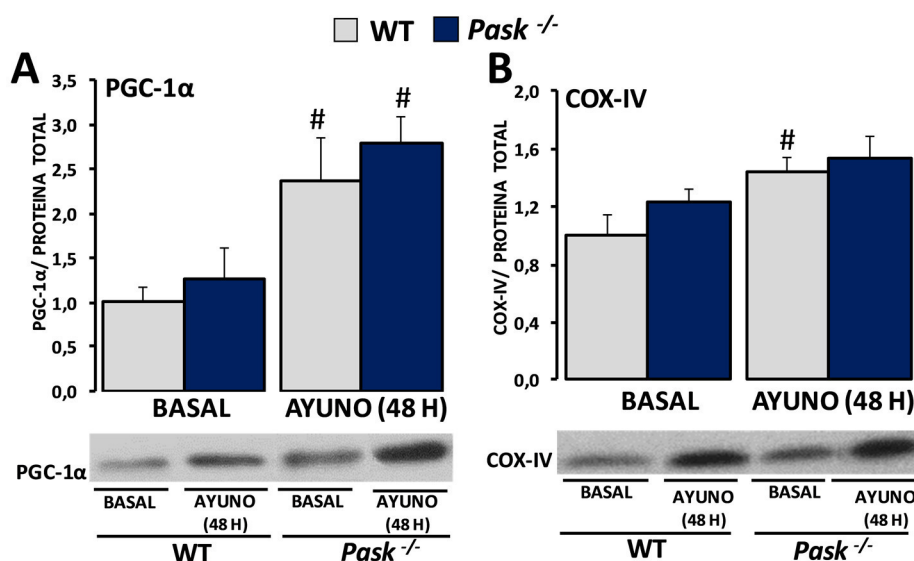
**Figura 22. Efectos de la deficiencia de PASK en la expresión de varios genes hepáticos implicados en la biogénesis y la función mitocondrial.**

La expresión génica de *Pgc-1α* (A), *Nrf2* (B), *Ppar-γ* (C), *Ppar-α* (D), *Cox-IV* (E) y *Cs* (F) fue analizada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Los niveles del ARNm fueron medidos en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 48 horas (AYUNO 48 H). El valor obtenido en los ratones WT BASAL fue considerado como 1. Las barras de los gráficos representan las medias ± SEM de los niveles de expresión, normalizados por el ARNm de la *β-Actina*, utilizado como gen control; n= 4-5 animales por condición. \*, *P*<0,05, \*\*, *P*<0,01, \*\*\*, *P*<0,001 WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; #, *P*<0,05, ##, *P*<0,01, ###, *P*<0,001 BASAL vs. AYUNO 48 H.

### 1.7. Los niveles de las proteínas PGC-1α y COX-IV no se encuentran alterados en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup>

Se analizaron los niveles de las proteínas PGC-1α y COX-IV, en hígado de ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup>.

El ayuno de 48 horas estimuló los niveles de la proteína PGC-1α, tanto en WT como en *Pask*<sup>-/-</sup> (Figura 23A). En cambio, los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> mantuvieron los mismos niveles de COX-IV, sin haber apenas diferencias entre el estado basal y el ayuno (Figura 23B).



**Figura 23. Efectos de la deficiencia de PASK en los niveles de las proteínas PGC-1α y COX-IV en hígado.**

Inmunoblots de PGC-1α (**A**) y COX-IV (**B**) en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>), en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 48 horas (AYUNO 48 H). Los lisados de hígado fueron procesados por Western blot. El valor obtenido en los ratones WT BASAL fue considerado como 1. Las barras de los gráficos representan las medias  $\pm$  SEM de los valores densitométricos, normalizados por la proteína total detectada por Stain-Free (PROTEINA TOTAL). Ver Anexos [Figura A1 (A)]; n= 4-5 animales por condición. #,  $P < 0,05$  BASAL vs. AYUNO 48 H.

### 1.8. La deficiencia de PASK incrementa la expresión hepática de *Sirt-1* y su localización subcelular es mayoritariamente nuclear

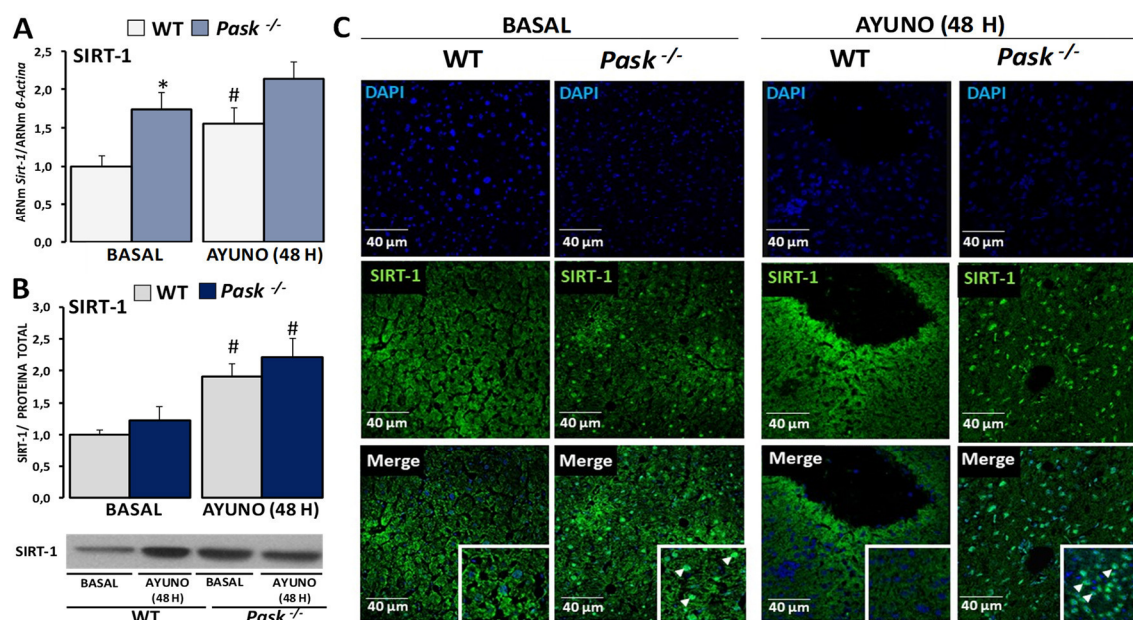
La SIRT-1 es una proteína desacetilasa cuya actividad disminuye notablemente los niveles de especies reactivas de oxígeno, modulando la expresión de diversos factores de transcripción localizados en el núcleo como PGC-1α; regulando el proceso de la biogénesis mitocondrial, y FoxO3a y p53; involucrados en la supervivencia y la muerte celular, respectivamente.

Se analizó la expresión del ARNm y la proteína de SIRT-1, en condición basal y ayuno de 48 horas. El ayuno prolongado (48 horas) aumentó el ARNm y la proteína de SIRT-1, en hígado de ratón de tipo WT (**Figura 24A, B**). De igual modo, en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup>, la proteína



SIRT-1 tendió a aumentar en el ayuno, siendo los niveles similares en WT que en *Pask*<sup>-/-</sup>, tanto en condición basal como en ayuno (**Figura 24B**). Además, aunque los ratones deficientes en PASK mostraron niveles de expresión más elevados, con respecto a WT, en condición basal, no hubo diferencias significativas a nivel de proteína (**Figura 24A, B**).

También, se estudió la localización subcelular de SIRT-1, pues su distribución núcleo-citoplasma es fundamental para su regulación y actividad (Bai and Zhang, 2016; Tanno et al., 2007). Para ello, se hizo inmunohistoquímica de secciones de hígado de ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup>, en condición basal y ayuno de 48 horas.



**Figura 24. Efectos de la deficiencia de PASK en la expresión del ARNm, la proteína y la distribución subcelular de SIRT-1.**

Los niveles del ARNm de *Sirt-1* (**A**) fueron analizados por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), inmunoblot de SIRT-1 (**B**) e inmunohistoquímica de SIRT-1 (**C**), en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 48 horas (AYUNO 48 H). El valor obtenido en los ratones WT BASAL fue considerado como 1. Las barras del gráfico en **A** representan las medias  $\pm$  SEM de los niveles de expresión normalizados por el ARNm de la  $\beta$ -Actina, en **B** representan las medias  $\pm$  SEM de los valores densitométricos, normalizados por la proteína total detectada por Stain-Free (PROTEINA TOTAL). Ver Anexos [Figura A1 (B)]; n= 4-5 animales por condición. \*,  $P < 0,05$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; #,  $P < 0,05$  BASAL vs. AYUNO 48 H.

La distribución subcelular de SIRT-1 (**C**) fue visualizada en color verde (Alexa 488 acoplado a un anticuerpo secundario). El núcleo fue marcado con DAPI (azul fluorescente). Las flechas indican localización nuclear.

De este modo, la SIRT-1 se ubicó mayoritariamente en el citosol de los hepatocitos de tipo WT, en ambas condiciones (basal y ayuno). Sin embargo, la localización de dicha proteína en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> fue mayoritariamente nuclear (**Figura 24C**).

Tales resultados nos indicaron que la deficiencia de PASK alteró la localización subcelular de la SIRT-1, en las condiciones analizadas (ayuno y alimentación).

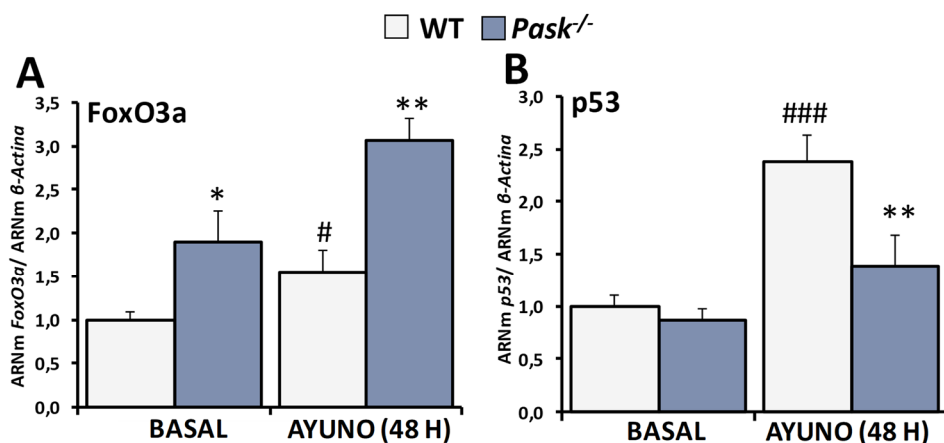
### **1.9. La deficiencia de PASK regula la expresión hepática de *FoxO3a* y *p53*, involucrados en mecanismos de supervivencia y reparación celular**

*FoxO3a* (*Forkhead box O*) es un factor de transcripción que participa en supervivencia celular, ya que regula la expresión de enzimas antioxidantes como SOD-Mn y CAT.

Por otro lado, *p53* o proteína supresora de tumores puede facilitar la actividad antioxidante, pues estimula la expresión de GPx, en condiciones de bajo estrés oxidativo. En cambio, tras un daño irreparable del ADN, activa mecanismos de reparación o la apoptosis.

Se analizó la expresión del ARNm de *FoxO3a* y *p53*, en hígado de ratones de tipo WT y *Pask*<sup>-/-</sup>, en condición basal y ayuno de 48 horas.

El ayuno de 48 horas indujo la expresión de los genes *FoxO3a* y *p53*, en los ratones WT (**Figura 25A, B**). Aunque, los *Pask*<sup>-/-</sup> mostraron mayor expresión génica de *Foxo3a*, en ambas condiciones (basal y ayuno) (**Figura 25A**). Sin embargo, la expresión del ARNm de *p53* en situación de ayuno, fue significativamente menor en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup>, con respecto a WT ( $1,39 \pm 0,29$  vs.  $2,38 \pm 0,24$ ) (**Figura 25B**).



**Figura 25. Efectos de la deficiencia de PASK en la expresión hepática de *FoxO3a* y *p53*.**

La expresión génica de *FoxO3a* (A) y *p53* (B) fue analizada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Los niveles del ARNm fueron medidos en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 48 horas (AYUNO 48 H). El valor obtenido en los ratones WT BASAL fue considerado como 1. Las barras de los gráficos representan las medias  $\pm$  SEM de los niveles de expresión, normalizados por el ARNm de la  $\beta$ -Actina, utilizado como gen control; n= 4-5 animales por condición. \*,  $P < 0,05$ , \*\*,  $P < 0,01$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; #,  $P < 0,05$ , ###,  $P < 0,001$  BASAL vs. AYUNO 48 H.

### 1.10. La deficiencia de PASK induce la expresión de enzimas antioxidantes

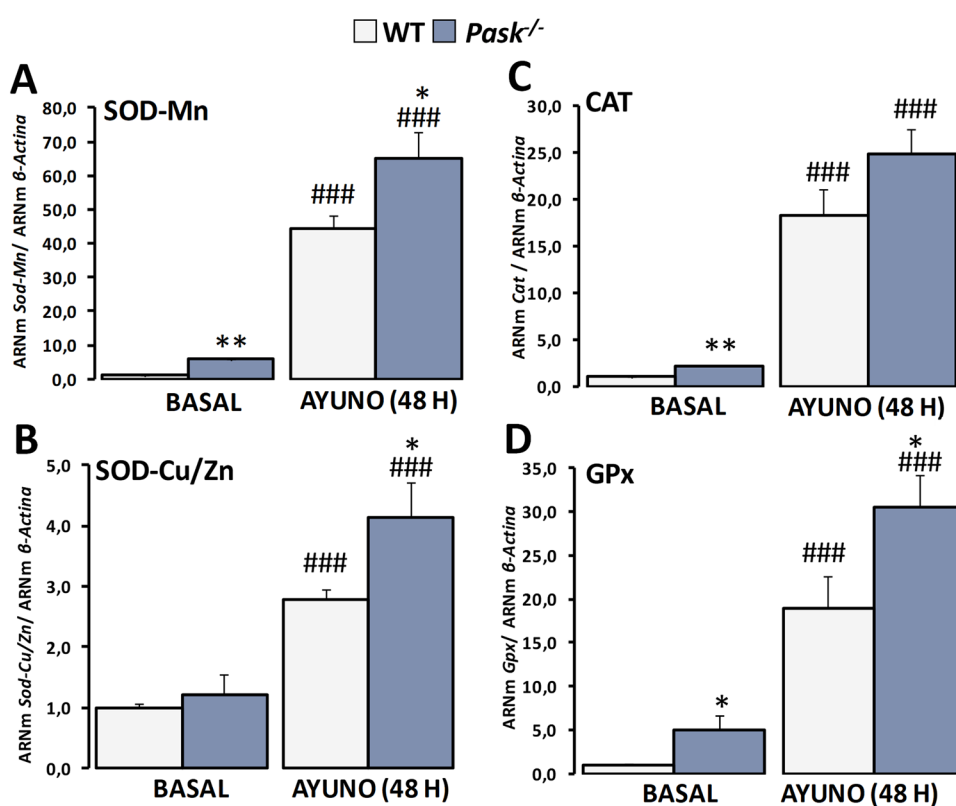
El hígado posee diversos mecanismos de defensa como las enzimas antioxidantes, con el fin de eliminar el exceso de especies reactivas de oxígeno.

Para determinar el papel de PASK sobre la respuesta antioxidante hepática, se analizó la expresión de algunas enzimas antioxidantes que participan en la defensa frente a ROS como la SOD-Mn, SOD-Cu/Zn, CAT y GPx.

El ayuno prolongado (48 horas) aumentó la expresión de todas las enzimas antioxidantes (Figura 26A, B, C, D), siendo en la mayoría de los casos significativamente mayor en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup>, con respecto a WT (Figura 26A, B, D).

Además, los ratones deficientes en PASK en estado basal, expresaron mayores niveles de enzimas antioxidantes tales como SOD-Mn ( $5,80 \pm 0,14$ ) (**Figura 26A**), CAT ( $2,11 \pm 0,12$ ) (**Figura 26C**) y GPx ( $4,95 \pm 1,60$ ) (**Figura 26D**).

Estos datos podrían confirmar que la deficiencia de PASK en hígado atenuaba la producción de especies reactivas de oxígeno, como consecuencia de una regulación coordinada entre el metabolismo oxidativo y los sistemas de protección antioxidante.



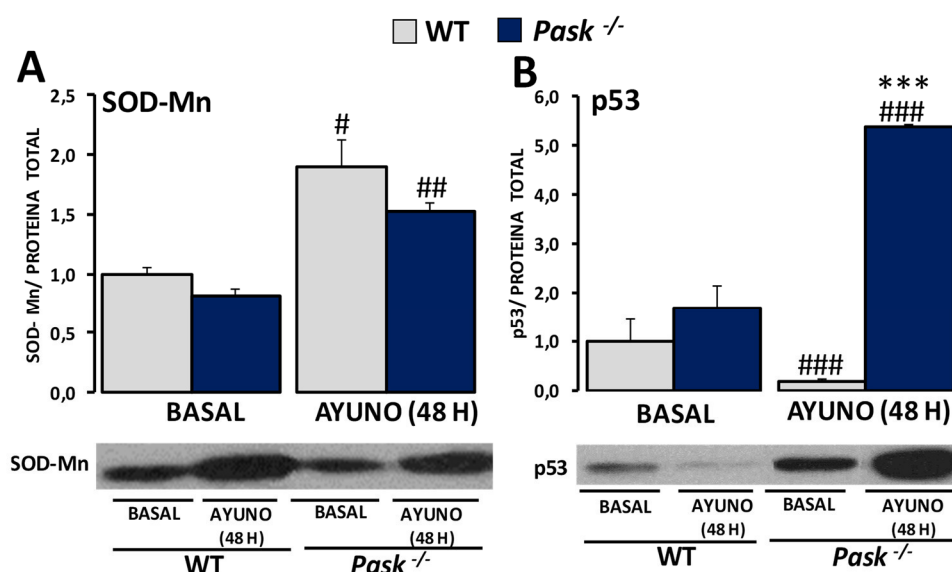
**Figura 26. Efectos de la deficiencia de PASK en la expresión de varios genes de enzimas antioxidantes.**

La expresión génica de *Sod-Mn* (A), *Sod-Cu/Zn* (B), *Cat* (C) y *Gpx* (D) fue analizada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Los niveles del ARNm fueron medidos en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 48 horas (AYUNO 48 H). El valor obtenido en los ratones WT BASAL fue considerado como 1. Las barras de los gráficos representan las medias  $\pm$  SEM de los niveles de expresión, normalizados por el ARNm de la  $\beta$ -Actina, utilizado como gen control; n= 4-5 animales por condición. \*,  $P < 0,05$ , \*\*,  $P < 0,01$ , WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; ###,  $P < 0,001$  BASAL vs. AYUNO 48 H.

### 1.11. La deficiencia de PASK altera los niveles de las proteínas SOD-Mn y p53

Se ha visto que la actividad antioxidante de la enzima mitocondrial SOD-Mn puede alterarse como consecuencia de la proteína supresora de tumores p53, activando mecanismos apoptóticos. p53 se caracteriza por tener una vida media corta, en condiciones fisiológicas normales. Su estabilidad y actividad están finamente reguladas por diversos estímulos frente al estrés metabólico (Robbins and Zhao, 2012).

El ayuno prolongado (48 horas) aumentó los niveles proteicos de SOD-Mn (**Figura 27A**), en cambio p53 disminuyó a niveles casi indetectables en los ratones WT, mientras que en *Pask*<sup>-/-</sup>, p53 aumentó significativamente (~3 veces) (**Figura 27B**).



**Figura 27. Efectos de la deficiencia de PASK en los niveles de las proteínas SOD-Mn y p53.**

Inmunoblots de SOD-Mn (**A**) y p53 (**B**) en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 48 horas (AYUNO 48 H). Los lisados de hígado fueron procesados por Western blot. El valor obtenido en los ratones WT BASAL fue considerado como 1. Las barras de los gráficos representan las medias  $\pm$  SEM de los valores densitometrados, normalizados por la proteína total detectada por Stain-Free (PROTEÍNA TOTAL). Ver Anexos [Figura A1 (C, D)]; n= 4-5 animales por condición. \*\*\*,  $P < 0,001$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; #,  $P < 0,05$ , ##,  $P < 0,01$ , ###,  $P < 0,001$  BASAL vs. AYUNO 48 H.

Por tanto, en ayuno, los niveles de p53 fueron mayores en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> que, en los WT, mientras que los niveles proteicos de SOD-Mn fueron similares (**Figura 27A, B**), dato que no se correspondió con la expresión de su ARNm (**Figura 26A**).

### **1.12. La deficiencia de PASK altera la expresión de NRF2, GCLm y miR-433, implicados en el control del estado redox celular**

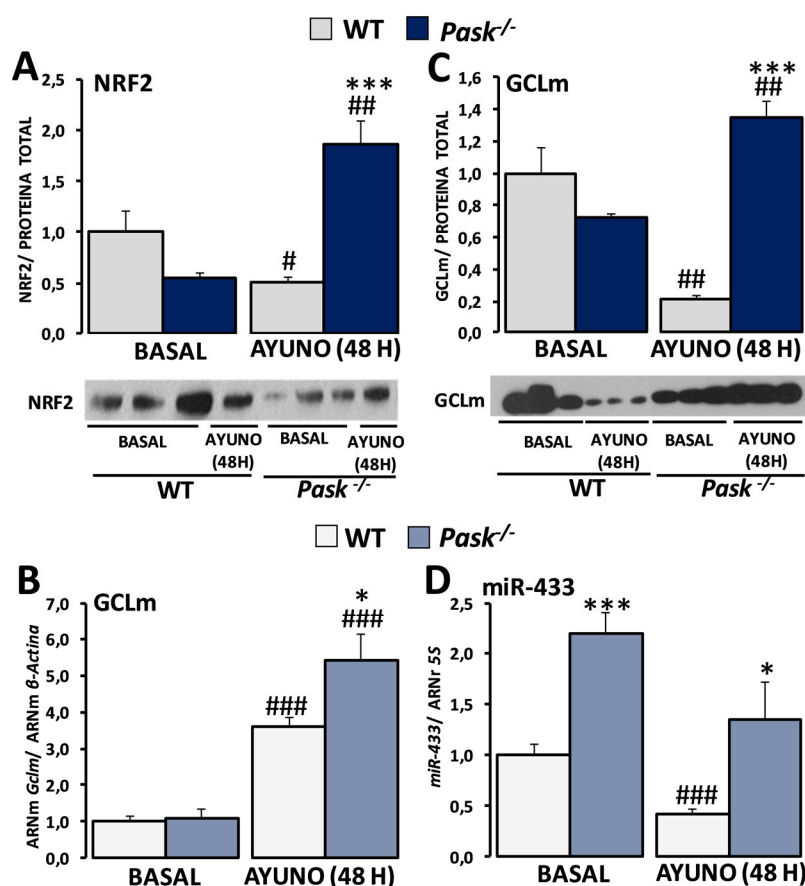
El factor de transcripción NRF2 es el principal regulador del estado redox celular, pues en situaciones de elevado ROS, NRF2 se transloca al núcleo y regula la transcripción de varias enzimas redox como la glutamato cisteína ligasa (GCL), tanto la subunidad catalítica (GCLc) como la reguladora (GCLm), involucradas en la biosíntesis del glutatión, un potente antioxidante endógeno no enzimático.

Se estudió el efecto de la deficiencia de PASK sobre el factor de transcripción NRF2 y su diana directa GCLm.

El ayuno prolongado (48 horas) disminuyó ~2 veces los niveles de la proteína NRF2 (**Figura 28A**) y ~5 veces GCLm (**Figura 28C**), sin embargo, la expresión génica de *Gclm* aumentó significativamente (**Figura 28B**), en los ratones WT. Aunque, la deficiencia de PASK aumentó considerablemente los niveles proteicos de NRF2, y la expresión génica y proteica de GCLm, en condiciones de ayuno (**Figura 28A, B, C**).

La expresión génica y proteica de GCLm no fue concordante en los ratones WT ayunados, quizás por posibles modificaciones post-transcripcionales. Por ello, se analizó la expresión del miR-433, ya que estudios previos habían descrito que el gen *Gclm* podría ser una diana de acción para este miARN, implicándolo en el control de la homeostasis redox (Espinosa-Diez et al., 2015).

La expresión del miR-433 disminuyó en el ayuno prolongado (48 horas) en los ratones WT. Además, PASK moduló la expresión del miR-433, pues su expresión aumentó, tanto en condición basal como en ayuno, en los ratones deficientes en PASK (**Figura 28D**).



**Figura 28. Efectos de la deficiencia de PASK en la expresión de NRF2, GCLm y miR-433.**

Inmunoblots de NRF2 (**A**) y GCLm (**C**) en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 48 horas (AYUNO 48 H). Los lisados de hígado fueron procesados mediante Western blot. La expresión del ARNm de *Gclm* (**B**) y del miR-433 (**D**) fue analizada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), en hígado de ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup>. El valor obtenido en los ratones WT BASAL fue considerado como 1. Las barras de los gráficos en **A** y **C** representan las medias  $\pm$  SEM de los valores densitometrados, normalizados por la proteína total detectada por Stain-Free (PROTEINA TOTAL). Ver Anexos [Figura A2 (A, B)]; **B** y **D** representan las medias  $\pm$  SEM de los niveles de expresión, normalizados por el ARNm de la  $\beta$ -Actina y el ARNr 5S, utilizados como genes controles, respectivamente; n= 4-5 animales por condición. \*,  $P < 0,05$ , \*\*\*,  $P < 0,001$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; #,  $P < 0,05$ , ##,  $P < 0,01$ , ###,  $P < 0,001$  BASAL vs. AYUNO 48 H.

### 1.13. La deficiencia de PASK activa la proteína Akt en condición de ayuno

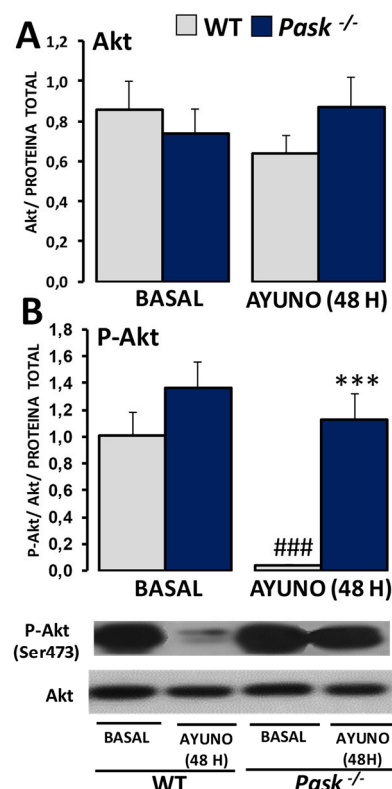
La vía de señalización NRF2/KEAP1 puede ser regulada a nivel transcripcional o post-traduccional. Precisamente, la ruta de señalización PI3K/Akt (Fosfatidilinositol 3-quinasa/Proteína quinasa B) facilita la inducción de este sistema redox, teniendo un papel fundamental en la supervivencia celular.

Por ello, se analizaron los niveles de la proteína Akt activada en hígado de ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup>.

La deficiencia de PASK no alteró el nivel total de la proteína Akt, siendo similar a WT, en todas las condiciones analizadas (**Figura 29A**).

El estado de activación de Akt fue detectado con anti-fosfo-Akt (Ser473). Los niveles de la forma activada de Akt fueron ligeramente más elevados en los ratones deficientes en PASK que en WT, en estado basal (**Figura 29B**). El ayuno prolongado (48 horas) redujo drásticamente la cantidad de Akt activada en los ratones WT, mientras que en los *Pask*<sup>-/-</sup> se mantuvo igualmente activada (**Figura 29B**).

Por tanto, PASK participaba en el control de la proteína Akt activada, en respuesta al ayuno prolongado, dado que su deficiencia ocasionaba un



**Figura 29. Efectos de la deficiencia de PASK en los niveles de la proteína Akt activada.**

Inmunoblots de la proteína total Akt (**A**) y fosfo-Akt (Ser473) (P-Akt) (**B**) en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 48 horas (AYUNO 48 H). Los lisados de hígado fueron procesados por Western blot. El valor obtenido en los ratones WT BASAL fue considerado como 1. Las barras de los gráficos representan las medias  $\pm$  SEM de los valores densitometrados, normalizados por la proteína total detectada por Stain-Free (PROTEINA TOTAL). Ver Anexos [Figura A2 (C, D)]; n= 4-5 animales por condición. \*\*\*,  $P < 0,001$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; ###,  $P < 0,001$  BASAL vs. AYUNO 48 H.



estado permanentemente activo, a pesar de estar bajo condiciones (ayuno prolongado) que deberían inactivarla.

### 1.14. La deficiencia de PASK estimula la activación de ERK1/2 y PCNA

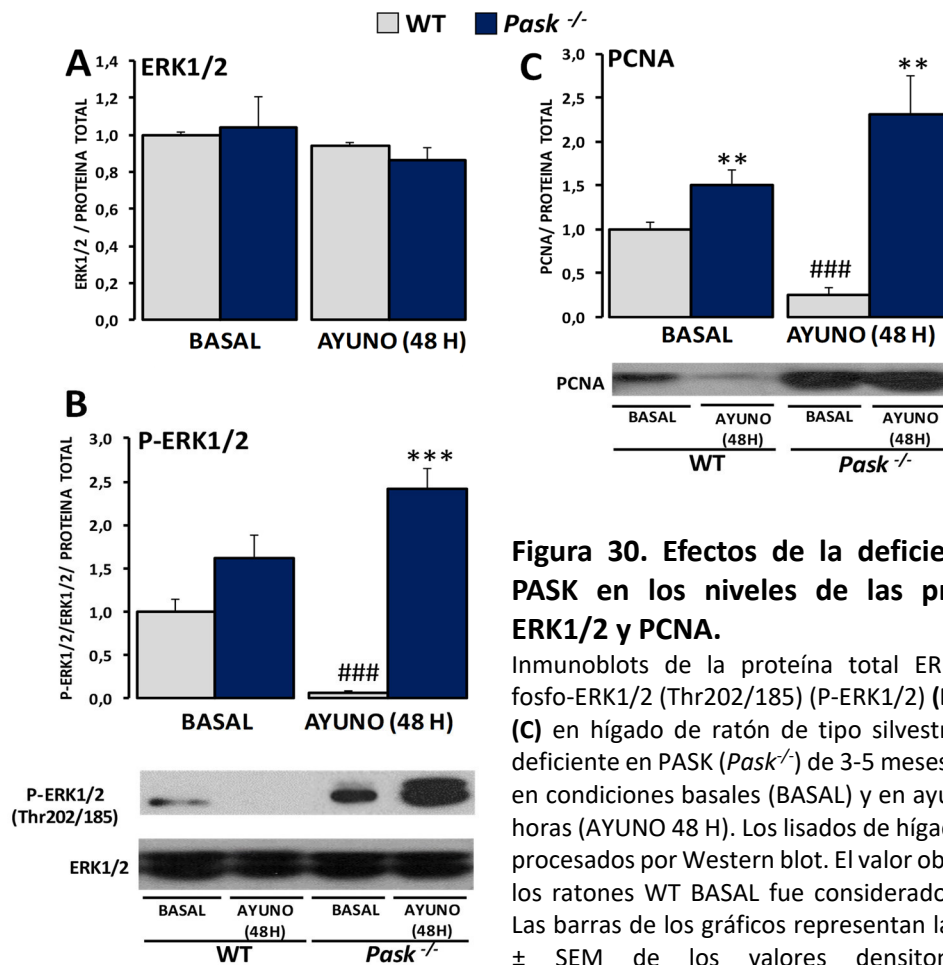
Las especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen una función primordial en la señalización celular y proliferación.

De este modo, la producción de ROS, especialmente  $H_2O_2$ , juega un papel fundamental en la transducción de señales de muchas proteínas quinasas como las activadas por mitógenos (MAPK). Éstas se encargan de regular la proliferación, supervivencia o muerte celular, y, además, la reparación celular. Asimismo, una de las principales proteínas involucradas en reparación de daños frente a estímulos estresantes es la PCNA (Juhasz et al., 2017).

Para estudiar el papel que juega PASK en proliferación, supervivencia y reparación celular, se analizaron los niveles de las proteínas ERK1/2, dos miembros de la familia de las MAP quinasas, y la proteína PCNA.

La deficiencia de PASK no alteró el nivel total de ERK1/2, siendo similar al de los WT, en todas las condiciones analizadas (**Figura 30A**).

El estado de activación de ERK1/2 fue detectado con anti-fosfo-ERK1/2 (Thr202/185). De tal modo, que el grado de activación tendió a ser mayor en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup>, en las condiciones analizadas (**Figura 30B**), especialmente en el ayuno, y lo mismo sucedió con la proteína PCNA (**Figura 30C**). Además, el ayuno prolongado (48 horas) redujo drásticamente los niveles de ERK1/2 activa y de proteína PCNA en los ratones WT, mientras que en *Pask*<sup>-/-</sup> ambas proteínas se mantuvieron elevadas (**Figura 30B, C**).



**Figura 30. Efectos de la deficiencia de PASK en los niveles de las proteínas ERK1/2 y PCNA.**

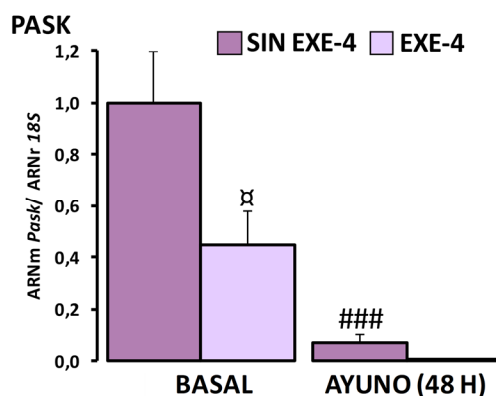
Inmunoblots de la proteína total ERK1/2 (A), fosfo-ERK1/2 (Thr202/185) (P-ERK1/2) (B) y PCNA (C) en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 48 horas (AYUNO 48 H). Los lisados de hígado fueron procesados por Western blot. El valor obtenido en los ratones WT BASAL fue considerado como 1. Las barras de los gráficos representan las medias  $\pm$  SEM de los valores densitometrados, normalizados por la proteína total detectada por Stain-Free (PROTEINA TOTAL). Ver Anexos [Figura A3 (A, B, C)]; n= 4-5 animales por condición. \*\*,  $P < 0,01$ , \*\*\*,  $P < 0,001$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; ###,  $P < 0,001$  BASAL vs. AYUNO 48 H.

## 2. EL EFECTO DE LA EXENDINA-4 EN LA EXPRESIÓN DEL GEN *Pask* Y EN EL ESTRES OXIDATIVO, E IMPORTANCIA DE PASK EN LA SEÑALIZACIÓN DE GLP-1 EN EL HÍGADO

### 2.1. La exendina-4 inhibe la expresión hepática del gen *Pask*

La expresión del gen *Pask* fue analizada en hígado, bajo condiciones basales y ayuno de 48 horas, en ausencia o presencia de exendina-4 (250 ng/ 100 g peso).

La expresión hepática de *Pask* fue regulada por la disponibilidad de nutrientes, reduciéndose drásticamente, tras un ayuno prolongado (**Figura 31**). Además, el tratamiento con exendina-4 redujo la expresión génica de *Pask* un  $55,00 \pm 7,70$  % en estado basal, mientras que en ayuno prácticamente la bloqueó (**Figura 31**).



**Figura 31. El efecto de la exendina-4 en la expresión del gen *Pask* en hígado.**

La expresión génica de *Pask* fue analizada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Los niveles del ARNm fueron medidos en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) de 3-5 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 48 horas (AYUNO 48 H), en ausencia (SIN EXE-4) o presencia de exendina-4 (EXE-4) (250 ng/100 g peso). El valor obtenido en la condición BASAL SIN EXE-4 fue considerado como 1. Las barras del gráfico representan las medias  $\pm$  SEM de los niveles de expresión, normalizados por el ARNr 18S, utilizado como gen control.; n= 4-5 animales por condición. ###,  $P < 0,001$  BASAL vs. AYUNO 48 H; α,  $P < 0,05$  SIN EXE-4 vs. EXE-4.

## 2.2. La deficiencia de PASK altera los niveles endógenos de GLP-1

Se analizaron las concentraciones de GLP-1 (pM) en plasma de ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup> de 3-5 meses de edad, en condiciones basales y en ayuno de 48 horas.

Nuestros resultados indicaron que el ayuno prolongado (48 horas) disminuyó los niveles plasmáticos de GLP-1 en los ratones WT. Sin embargo, la deficiencia de PASK

aumentó significativamente los niveles endógenos de GLP-1, en condiciones de ayuno. En cambio, en estado basal, los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> presentaron menor concentración plasmática de GLP-1, respecto a los controles (Tabla 9).

Estado nutricional	Concentración plasmática de GLP-1 (pM)	
	WT	<i>Pask</i> <sup>-/-</sup>
BASAL	4,13 ± 1,15	0,74 ± 0,17 *
AYUNO (48 H)	0,56 ± 0,10 <sup>#</sup>	1,75 ± 0,08 <sup>##</sup> ***

**Tabla 9. Efecto de la deficiencia de PASK en la concentración plasmática de GLP-1.**

Las concentraciones de GLP-1 (pM) en plasma de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 meses de edad se midieron en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 48 horas (AYUNO 48 H) mediante un ELISA. La tabla muestra los valores medios ± SEM de las concentraciones plasmáticas de GLP-1; n= 4-5 animales por condición. \*,*P*<0,05, \*\*,*P*<0,001 WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; #,*P*<0,05, ##,*P*<0,01 BASAL vs. AYUNO (48 H).

### 2.3. La exendina-4 reduce la producción de ROS e incrementa la expresión génica de algunas enzimas antioxidantes

Para estudiar el efecto de la exendina-4 en el control del estado redox, se analizó el contenido de ROS (ROS/RNS) y los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes: SOD-Mn, SOD-Cu/Zn, CAT y GPx.

Estado nutricional	Descenso de ROS (%) en ratones tratados con exendina-4 (250 ng/ 100 g peso)	
	WT	<i>Pask</i> <sup>-/-</sup>
BASAL	14,34 ± 0,23 <sup>‡</sup>	1,80 ± 0,06 **
AYUNO (48 H)	7,33 ± 0,20	10,70 ± 0,26 <sup>‡‡‡</sup>

**Tabla 10. Porcentaje del descenso de ROS en ratones tratados con exendina-4.**

Los ratones de tipo silvestres (WT) y deficientes en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 meses de edad fueron tratados con exendina-4 (250 ng/ 100 g peso) durante 3 horas. Se analizó el contenido de ROS/RNS en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 48 horas (AYUNO 48 H). La tabla muestra los valores medios ± SEM del descenso de ROS, expresado en porcentaje; n= 4-5 animales por condición.

\*\*, *P* < 0,01 WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; ‡, *P* < 0,05, ‡‡‡, *P* < 0,001 SIN EXE-4 vs. EXE-4.

Los resultados indicaron que el tratamiento con exendina-4 redujo el contenido de especies reactivas de oxígeno (ROS/RNS), tanto en WT como en *Pask*<sup>-/-</sup> (Tabla 10). En situación basal, el efecto de la exendina-4 fue menor en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup>, con respecto a WT ( $1,80 \pm 0,06$  % vs.  $14,34 \pm 0,23$  %), sin embargo, se observó que su efecto fue más potente en el ayuno (Tabla 10).

También, la exendina-4 estimuló la expresión génica de algunas enzimas antioxidantes, en la mayoría de los casos, tanto en WT como en *Pask*<sup>-/-</sup> (Tabla 11). Además, la acción estimuladora de la exendina-4 sobre la expresión de la enzima catalasa fue mayor en los ratones deficientes en PASK, tanto en condición basal como en ayuno (Tabla 11).

Enzima antioxidante	Estado nutricional	Incremento o Descenso de expresión (%) en ratones tratados con exendina-4 (250 ng/ 100 g peso)	
		WT	<i>Pask</i> <sup>-/-</sup>
SOD-Mn	BASAL	$1.012 \pm 86^{\text{xxx}}$	$68 \pm 8^{\text{xxx}***}$
	AYUNO (48 H)	$269 \pm 15^{\text{xxx}}$	$270 \pm 44^{\text{xxx}}$
SOD-Cu/Zn	BASAL	$42 \pm 4^{\text{xx}}$	$64 \pm 6^{\text{xx}}$
	AYUNO (48 H)	$133 \pm 23^{\text{xxx}}$	$150 \pm 10^{\text{xxx}}$
CAT	BASAL	$100 \pm 41^{\text{xxx}}$	$307 \pm 13^{\text{xxx}***}$
	AYUNO (48 H)	$-30 \pm 4$	$4 \pm 1^{**}$
GPx	BASAL	$491 \pm 74^{\text{xx}}$	$288 \pm 7^{\text{xxx}}$
	AYUNO (48 H)	$99 \pm 5^{\text{xxx}}$	$146 \pm 17^{\text{xxx}}$

**Tabla 11. Efecto de la exendina-4 sobre la expresión génica de las enzimas antioxidantes.**

Se determinaron los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes: SOD-Mn, SOD-Cu/Zn, CAT y GPx en ausencia o presencia de exendina-4 (250 ng/100 g peso), en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 48 horas (AYUNO 48 H). La tabla muestra los valores medios  $\pm$  SEM del efecto de la exendina-4 sobre la expresión de las enzimas antioxidantes, expresado en porcentaje; n= 4-5 animales por condición. \*\*,  $P < 0,01$ , \*\*\*,  $P < 0,001$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; x,  $P < 0,05$ , xx,  $P < 0,01$ , xxx,  $P < 0,001$  SIN EXE-4 vs. EXE-4.

## 2.4. La exendina-4 promueve la expresión hepática de *Ppar-γ* y *Cox-IV* e inhibe la de *Nrf2*, *Gclm*, *Sirt-1* y *Cs*, dependiendo del estado nutricional

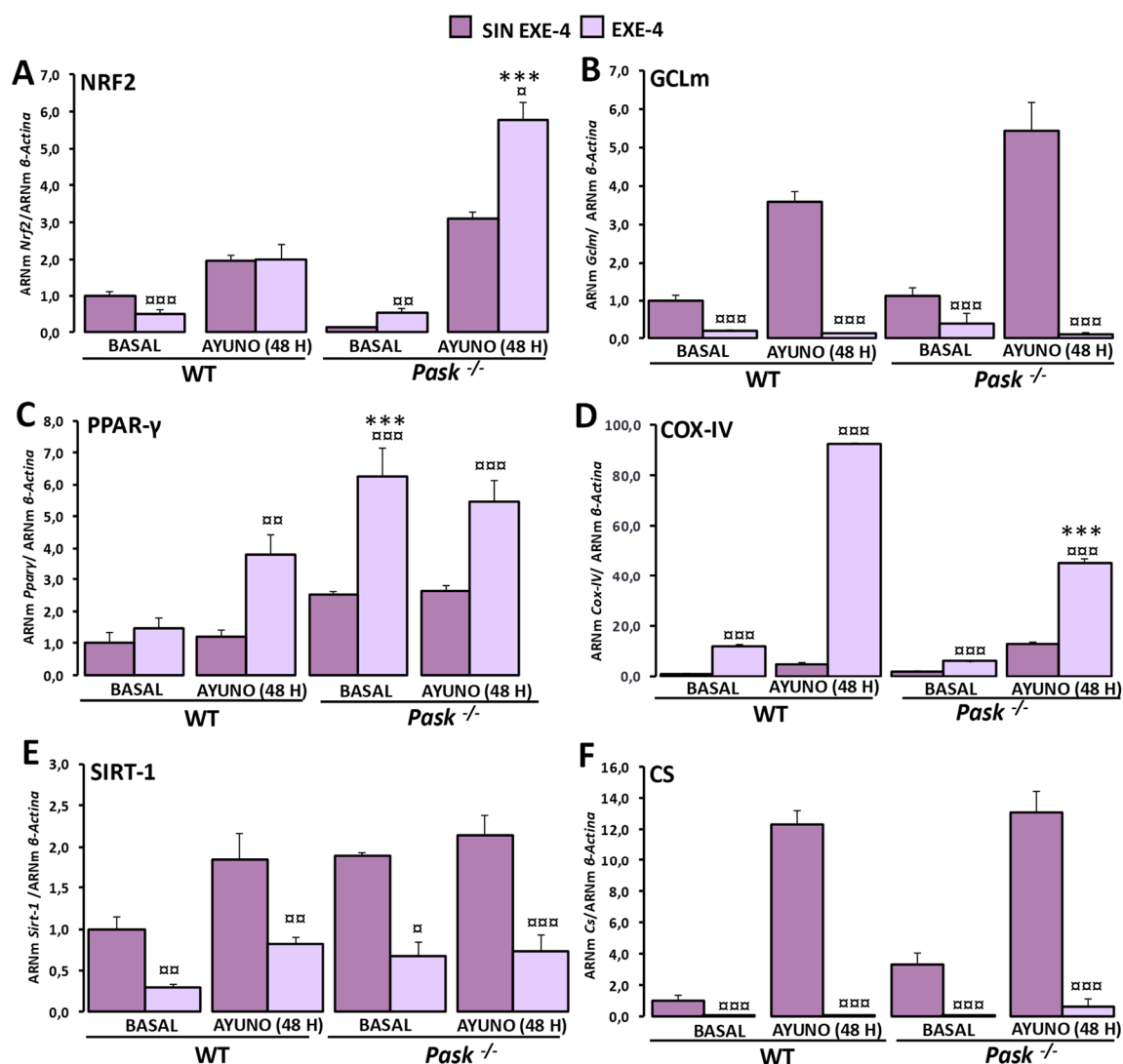
Se analizó la expresión del ARNm de *Nrf2*, *Gclm*, *Ppar-γ* y *Cox-IV*, en ausencia o presencia de exendina-4 (250 ng/100 g peso), para describir su efecto sobre la expresión de varios genes hepáticos implicados en el control del estado redox y la función mitocondrial.

La exendina-4 disminuyó la expresión del ARNm de *Nrf2*, en condición basal en los ratones WT, mientras que la expresión génica de *Cox-IV* aumentó (**Figura 32A, D**). La expresión del ARNm de *Ppar-γ* y *Cox-IV* fue estimulada por la exendina-4, en condiciones de ayuno prolongado (48 horas) (**Figura 32C, D**). Además, la deficiencia de PASK no impidió la acción de la exendina-4, incrementando significativamente la expresión de estos genes, tanto en estado basal como en ayuno (**Figura 32A, C, D**).

También, se estudió la acción de la exendina-4 en la expresión del ARNm de *Gclm*, ya que es diana directa de NRF2, y además el ARNm de *Sirt-1* (que participa en la biogénesis mitocondrial, regulando la actividad de PGC-1 $\alpha$  por desacetilación) y de *Cs*, una enzima mitocondrial.

El tratamiento con exendina-4 bloqueó la expresión del ARNm de *Gclm*, *Sirt-1* y *Cs* en todas las condiciones analizadas (basal y ayuno) (**Figura 32B, E, F**).

Esto podría indicar que el efecto de la exendina-4 era dependiente del estado nutricional y de PASK para ejercer su efecto en el control de la función mitocondrial.



**Figura 32. Efectos de la exendina-4 y la deficiencia de PASK en la expresión de varios genes hepáticos implicados en el control del estado redox y la función mitocondrial.**

La expresión génica de *Nrf2* (A), *Gclm* (B), *Ppar-γ* (C), *Cox-IV* (D), *Sirt-1* (E) y *Cs* (F) fue analizada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Los niveles del ARNm fueron medidos en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 48 horas (AYUNO 48 H), y en ausencia (SIN EXE-4) o presencia de exendina-4 (EXE-4) (250 ng/100 g peso). El valor obtenido en los ratones WT BASAL SIN EXE-4 fue considerado como 1. Las barras de los gráficos representan las medias ± SEM de los niveles de expresión, normalizados por el ARNm de la  $\beta$ -Actina, utilizado como gen control; n= 4-5 animales por condición. \*\*\*,  $P < 0,001$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; ¤,  $P < 0,05$ , ¤¤,  $P < 0,01$ , ¤¤¤,  $P < 0,001$  SIN EXE-4 vs. EXE-4.

## 2.5. La respuesta a nivel transcripcional y traduccional de PGC-1α a la exendina-4 es diferente. Posible implicación del miR-433 en la respuesta a la exendina-4

PGC-1α es el principal regulador de la biogénesis y la función mitocondrial. Se analizaron los niveles de expresión y la proteína en hígado de ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup>, en

condiciones basales y en ayuno de 48 horas, en ausencia o presencia de exendina-4 (250 ng/100 g peso).

Nuestros datos indicaron que la exendina-4 elevó la expresión del ARNm de *Pgc-1α* en los ratones WT ayunados, en cambio en los *Pask<sup>-/-</sup>* aumentó en cualquiera de las condiciones analizadas (basal y ayuno) (**Figura 33A**). Sin embargo, los niveles proteicos de PGC-1α disminuyeron en estado basal, tanto en WT como en *Pask<sup>-/-</sup>* (**Figura 33B**).

El tratamiento con exendina-4 en el ayuno prolongado (48 horas) no estimuló los niveles proteicos de PGC-1α en los ratones WT, pero sí en los ratones deficientes en PASK (**Figura 33B**). Estos resultados no coincidieron con los observados en la expresión de su ARNm (**Figura 33A**).

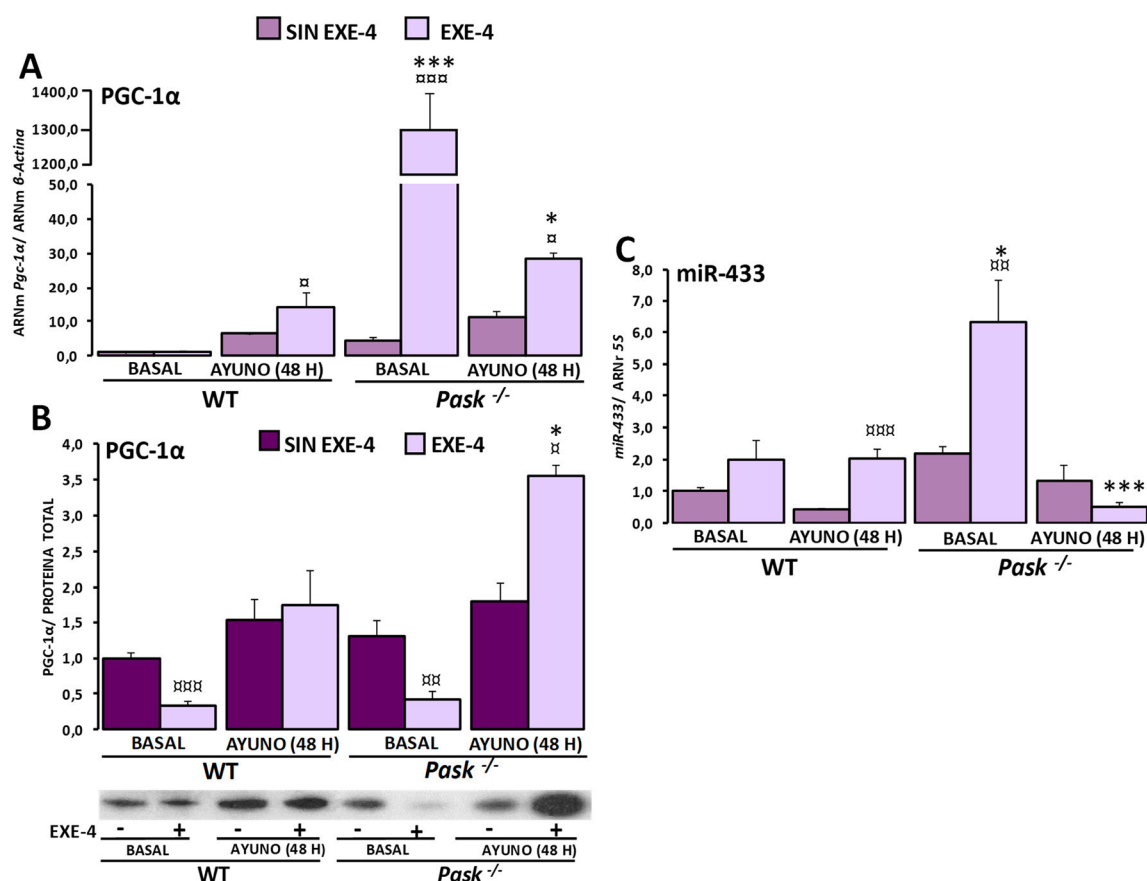
La actividad de PGC-1α puede ser regulada por fosforilación y desacetilación, mediante la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) y la SIRT-1, respectivamente. Pero, también puede sufrir modificaciones post-transcripcionales por miARNs. De tal modo que, se estudió la posibilidad de la intervención de miARNs en la regulación de PGC-1α por exendina-4.

Para ello, se empleó la base de datos de targetscan.org, que nos proporcionó una lista de los miARNs candidatos para actuar sobre el gen *Pgc-1α*. De los obtenidos, se eligió como candidato al miR-433, pues sabíamos que su expresión en hígado dependía de PASK y que este miARN se encontraba implicado en mecanismos de regulación de la homeostasis de la glucosa y en la proliferación y viabilidad celular (Wang, 2017).

Nuestros datos indicaron que la exendina-4 tendió a estimular la expresión del miR-433, en estado basal, siendo más potente en *Pask<sup>-/-</sup>* (**Figura 33C**). Ambas situaciones fueron coincidentes con un menor nivel de la proteína PGC-1α (**Figura 33B**), aunque en *Pask<sup>-/-</sup>*, los niveles del ARNm eran mayores (**Figura 33A**). Asimismo, la exendina-4 en el ayuno



prolongado incrementó la expresión del miR-433 ~5 veces en los ratones WT, mientras que en los *Pask*<sup>-/-</sup> tendió a disminuir (**Figura 33C**). Por tanto, en los ratones deficientes en PASK se observó que el efecto de la exendina-4 en la expresión de este miARN era dependiente del estado nutricional.



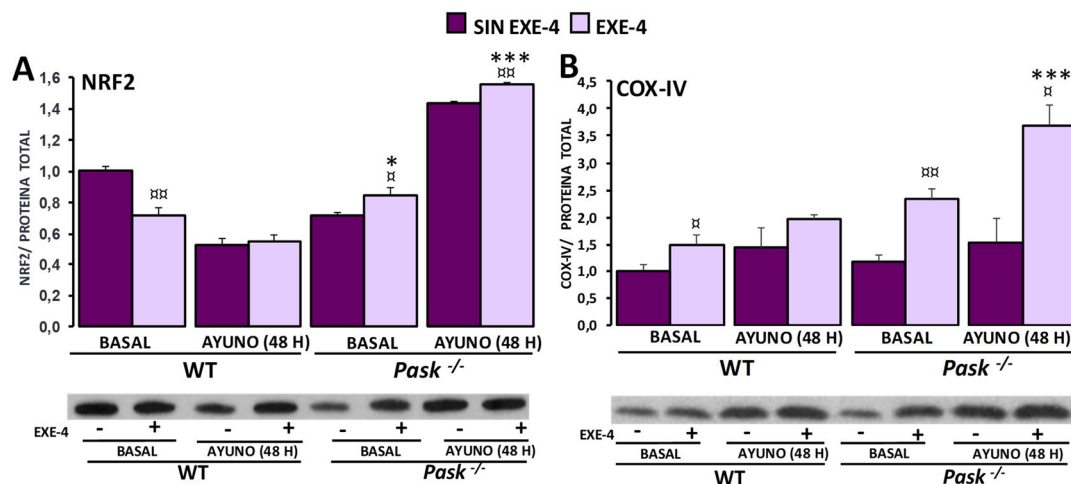
**Figura 33. Efectos de la exendina-4 y la deficiencia de PASK en la expresión génica y proteica de PGC-1α y del miR-433.**

La expresión del ARNm de *Pgc-1α* (**A**) y del miR-433 (**C**) fue analizada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 48 horas (AYUNO 48 H), y en ausencia (SIN EXE-4) o presencia de exendina-4 (EXE-4) (250 ng/100 g peso). (**B**) Inmunoblot de PGC-1α en hígado de ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup>. Los lisados de hígado fueron procesados mediante Western blot. El valor obtenido en los ratones WT BASAL SIN EXE-4 fue considerado como 1. Las barras de los gráficos en **A** y **C** representan las medias  $\pm$  SEM de los niveles de expresión, normalizados por el gen de la  $\beta$ -Actina y el ARNr 5S, utilizados como genes controles, respectivamente. **B** representan las medias  $\pm$  SEM de los valores densitométricos, normalizados por la proteína total detectada por Stain-Free (PROTEÍNA TOTAL). Ver Anexos [Figura A4 (A)]; n= 4-5 animales por condición. \*, $P < 0,05$ , \*\*\*, $P < 0,001$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; α, $P < 0,05$ , αα, $P < 0,01$ , ααα, $P < 0,001$  SIN EXE-4 vs. EXE-4.

## 2.6. La exendina-4 aumenta los niveles proteicos de NRF2 y COX-IV, siendo dependiente de PASK

Se estudió el efecto que tenía la exendina-4 sobre los niveles de la proteína del factor de transcripción NRF2, el cual regula la actividad de enzimas mitocondriales como COX-IV, involucrada en la función mitocondrial.

La exendina-4 disminuyó el nivel basal de la proteína NRF2, en los ratones WT, a diferencia de la proteína COX-IV, que aumentó. Sin embargo, en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> la exendina-4 tendió a estimular los niveles hepáticos de estas proteínas en ambas condiciones (basal y ayuno) (Figura 34A, B).



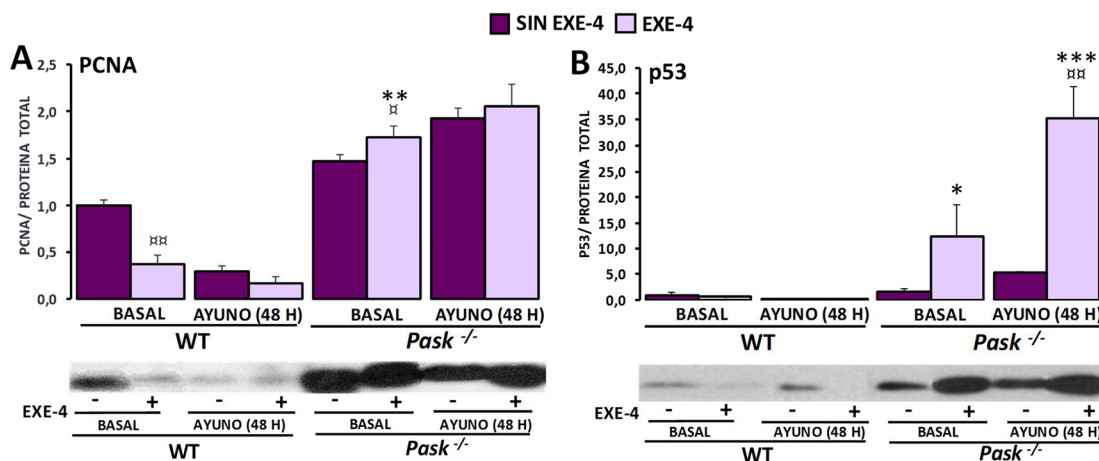
**Figura 34. Efectos de la exendina-4 y la deficiencia de PASK en los niveles hepáticos de las proteínas NRF2 y COX-IV.**

Inmunoblots de NRF2 (A) y COX-IV (B) en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 48 horas (AYUNO 48 H), y en ausencia (SIN EXE-4) o presencia de exendina-4 (EXE-4) (250 ng/100 g peso). Los lisados de hígado fueron procesados mediante Western blot. El valor obtenido en los ratones WT BASAL SIN EXE-4 fue considerado como 1. Las barras de los gráficos representan las medias  $\pm$  SEM de los valores densitometrados, normalizados por la proteína total detectada por Stain-Free (PROTEÍNA TOTAL). Ver Anexos [Figura A4 (A, B)]; n= 4-5 animales por condición. \*,  $P < 0,05$ , \*\*\*,  $P < 0,001$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; ¤,  $P < 0,05$ , ¤¤,  $P < 0,01$ , SIN EXE-4 vs. EXE-4.

## 2.7. La deficiencia de PASK estimula los niveles proteicos de PCNA y p53, y el tratamiento con exendina-4 potencia este efecto, dependiendo del estado nutricional

Se determinó el efecto que tenía la exendina-4 sobre los niveles de las proteínas PCNA y p53, éstas implicadas en proliferación y muerte celular, respectivamente, en hígado de ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup>.

La exendina-4 redujo los niveles proteicos de PCNA en mayor o menor medida en las condiciones analizadas (basal y ayuno), mientras que no modificó los niveles de p53 (**Figura 35A, B**). Sin embargo, la exendina-4 en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> potenció los niveles hepáticos de estas proteínas (**Figura 35A, B**), pero atendiendo al estado nutricional. Así, esta sobreexpresión fue especialmente importante en el caso de PCNA en condición basal (~1,5 veces) y de p53 en estado de ayuno (hasta ~7 veces) (**Figura 35A, B**).



**Figura 35. Efectos de la exendina-4 y la deficiencia de PASK en los niveles hepáticos de las proteínas PCNA y p53.**

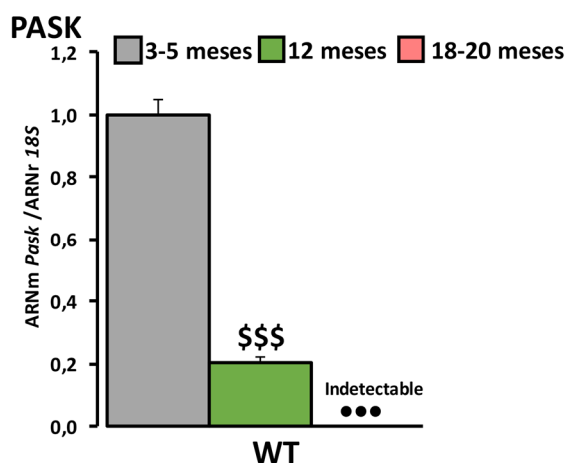
Inmunoblots de PCNA (**A**) y p53 (**B**) en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 48 horas (AYUNO 48 H), y en ausencia (SIN EXE-4) o presencia de exendina-4 (EXE-4) (250 ng/100 g peso). Los lisados de hígado fueron procesados mediante Western blot. El valor obtenido en los ratones WT BASAL SIN EXE-4 fue considerado como 1. Las barras de los gráficos representan las medias  $\pm$  SEM de los valores densitometrados, normalizados por la proteína total detectada por Stain-Free (PROTEINA TOTAL). Ver Anexos [Figura A4 (C, D)]; n= 4-5 animales por condición. \*,  $P < 0,05$ , \*\*,  $P < 0,01$ , \*\*\*,  $P < 0,001$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; ¤,  $P < 0,05$ , ¤¤,  $P < 0,01$  SIN EXE-4 vs. EXE-4.

### 3. IMPLICACIÓN DE PASK EN EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO

#### 3.1. La expresión hepática del gen *Pask* va disminuyendo durante el envejecimiento

Se analizó la expresión del gen *Pask* en ratones C57BL/6J de distintas edades (3-5, 12 y 18-20 meses) mediante qRT-PCR.

La expresión del ARNm de *Pask* disminuyó un  $80,00 \pm 6,25$  % a los 12 meses, respecto a los 3-5 meses, y llegó a ser indetectable a los 18-20 meses de edad (**Figura 36**).



**Figura 36. El efecto del envejecimiento en la expresión hepática del gen *Pask*.**

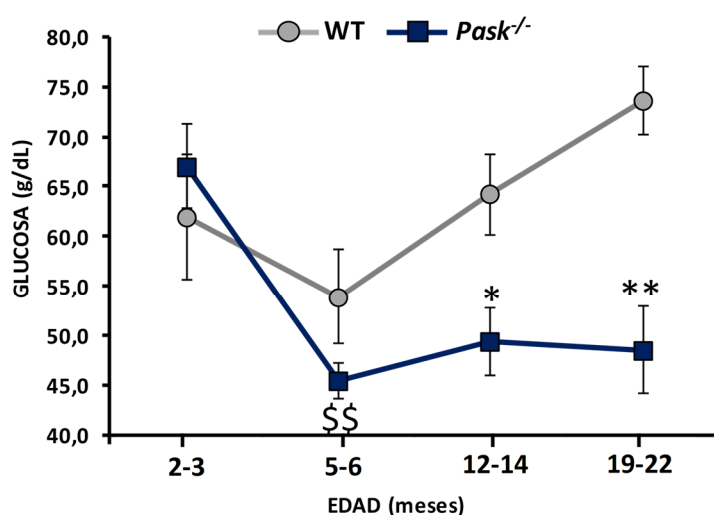
La expresión génica de *Pask* fue analizada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Los niveles del ARNm fueron medidos en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) de 3-5, 12 y 18-20 meses de edad, en condiciones basales. El valor obtenido en los ratones WT de 3-5 meses fue considerado como 1. Las barras del gráfico representan las medias  $\pm$  SEM de los niveles de expresión, normalizados por el ARNr 18S, utilizado como gen control; n= 4-5 animales por condición. \$\$\$,  $P < 0,001$  3-5 meses vs. 12 meses; •••,  $P < 0,001$  3-5 meses vs. 18-20 meses.

### 3.2. Los ratones envejecidos deficientes en PASK no desarrollan hiperglucemia e hiperinsulinemia, como consecuencia de la resistencia a la acción de la insulina

El envejecimiento se caracteriza por una serie de cambios a nivel fisiológico y molecular a lo largo del tiempo, como el desarrollo de resistencia a la acción de la insulina, cambios en la composición corporal, alteraciones en el perfil lipídico; conduciendo todo ello hacia el desarrollo de la diabetes tipo 2.

Los valores de glucosa en ayunas (24 horas) fueron recogidos a distintas edades en ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup>.

De este modo, mientras la concentración de glucosa en sangre fue elevándose en los ratones WT, a partir de los 5-6 meses; los deficientes en PASK mostraron un control de ésta, a lo largo de la edad (**Figura 37**).

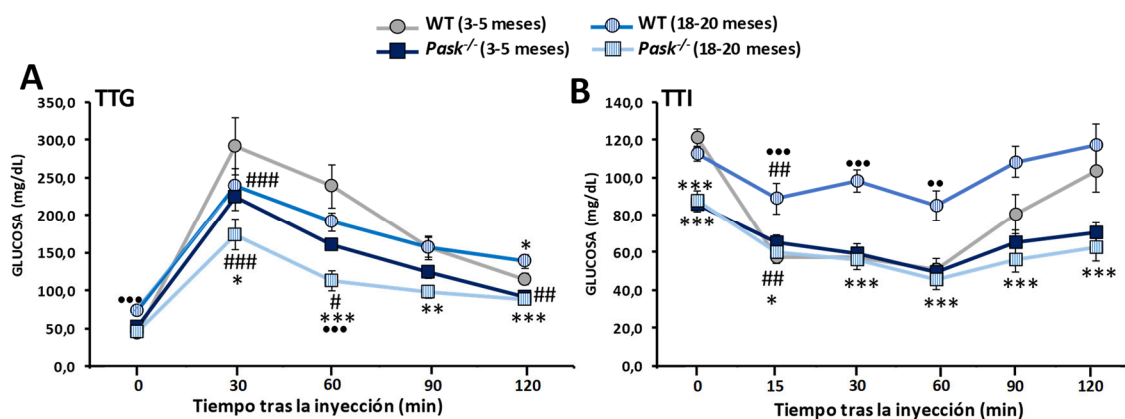


**Figura 37. Valores de glucosa en sangre en ayuno de 24 horas, a lo largo de la edad.**

Los ratones de tipo silvestres (WT) y deficientes en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de distintas edades (2-3, 5-6, 12-14, 19-22 meses) fueron ayunados durante 24 horas y se les midieron mediante un glucómetro los niveles de glucosa (g/dL) en sangre obtenida de la cola del animal. El gráfico de líneas representa las medias  $\pm$  SEM; n= 9-10 animales por condición. \$\$,  $P < 0,01$  2-3 meses vs. 5-6 meses; \*,  $P < 0,05$ , \*\*,  $P < 0,01$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>.

Además, se realizaron test de tolerancia a la glucosa (TTG) y test de tolerancia a la insulina (TTI), midiendo las concentraciones de glucosa en sangre en ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup>, de 3-5 y de 18-20 meses de edad.

La concentración de glucosa en sangre de los ratones WT (ayunados toda la noche) aumentó con la edad ( $43,60 \pm 1,94$  mg/dL a  $72,89 \pm 3,31$  mg/dL), mientras que los ratones deficientes en PASK mantuvieron la glucosa en concentraciones similares en cualquiera de las edades analizadas. Además, los datos obtenidos en el test de tolerancia a la glucosa indicaron que la concentración de glucosa se elevó rápidamente, a los 30 minutos de la inyección de glucosa (2 g/kg peso). Este incremento fue más significativo en los ratones de 18-20 meses de edad, tanto en WT como en *Pask*<sup>-/-</sup>. Asimismo, los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> de 18-20 meses mostraron niveles de glucosa más bajos en todos los tiempos analizados, con respecto a WT de la misma edad (**Figura 38A**).



**Figura 38. Test de Tolerancia a la glucosa (TTG) e insulina (TTI) en el envejecimiento.**

Los Tests de Tolerancia a la glucosa (TTG) (**A**) e insulina (TTI) (**B**) se realizaron en ratones de tipo silvestres (WT) y deficientes en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 y 18-20 meses de edad. Para ello, fueron ayunados durante toda la noche o 4 horas, según correspondiese, y se les inyectó intraperitonealmente la glucosa (2 g/kg peso) e insulina (1 U/kg peso), respectivamente. Las valoraciones de la glucosa en sangre obtenidas de la cola del animal se realizaron mediante un glucómetro en el momento inicial (antes de la inyección, tiempo 0) y a distintos tiempos (30, 60, 90 y 120 minutos, en el caso del TTG y 15, 30, 60, 90, 120 en el TTI). Los gráficos de líneas representan las medias  $\pm$  SEM; n= 4-5 animales por condición. #,  $P < 0,05$  30 min vs. 60 min, ##,  $P < 0,01$  0 min vs. 15 min; 90 min vs. 120 min, ###,  $P < 0,001$  0 min vs. 30 min; ••,  $P < 0,01$ , •••,  $P < 0,001$  3-5 meses vs. 18-20 meses; \*,  $P < 0,05$ , \*\*,  $P < 0,01$ , \*\*\*,  $P < 0,001$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>.

Además, hay que destacar que los ratones WT envejecidos, a los 120 minutos, tras la inyección de glucosa, siguieron manteniendo niveles elevados de glucosa (**Figura 38A**).

En cuanto al test de tolerancia a la insulina, los ratones WT, tras el ayuno de 4 horas previo a la inyección de insulina (1 U/kg peso), mostraron mayor concentración de glucosa en sangre, con respecto a *Pask*<sup>-/-</sup>, tanto en jóvenes ( $121,20 \pm 4,50$  mg/dL vs.  $85,73 \pm 3,98$  mg/dL) como en viejos ( $112,33 \pm 3,57$  mg/dL vs.  $87,90 \pm 5,06$  mg/dL) (**Figura 38B**). Además, a los 15 minutos tras la inyección de insulina, la glucosa disminuyó considerablemente de  $121,20 \pm 4,50$  mg/dL a  $57,13 \pm 3,13$  mg/dL en los ratones WT jóvenes, mientras que en los envejecidos, los niveles de glucosa se mantuvieron elevados, en cualquiera de los tiempos analizados (**Figura 38B**).

Por tanto, los ratones WT envejecidos desarrollaban una hiperglucemia por resistencia a la acción de la insulina, mientras que los *Pask*<sup>-/-</sup> de 18-20 meses respondían adecuadamente a la acción de la insulina, incluso de igual manera que los ratones WT jóvenes.

Por otra parte, se midió la concentración de insulina (ng/mL) en plasma. Nuestros datos indicaron que, aunque la concentración plasmática de insulina en los ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup> eran similares a los 3-5 meses de edad, en WT aumentaba significativamente con la edad. Sin embargo, en *Pask*<sup>-/-</sup> incrementó, pero en menor proporción, no llegando a alcanzar los niveles de insulina encontrados en los ratones WT (**Tabla 12**).

Además, se calculó el índice HOMA-IR, empleado para evaluar la resistencia a la insulina, utilizando como parámetros la glucosa y la insulina en ayunas. De este modo, los ratones WT viejos mostraron un HOMA-IR > 9,00; exhibiéndose claramente una elevada resistencia a la acción de la insulina, mientras que en *Pask*<sup>-/-</sup>, la sensibilidad a la insulina no se vio afectada en el proceso de envejecimiento (HOMA-IR < 2,00).

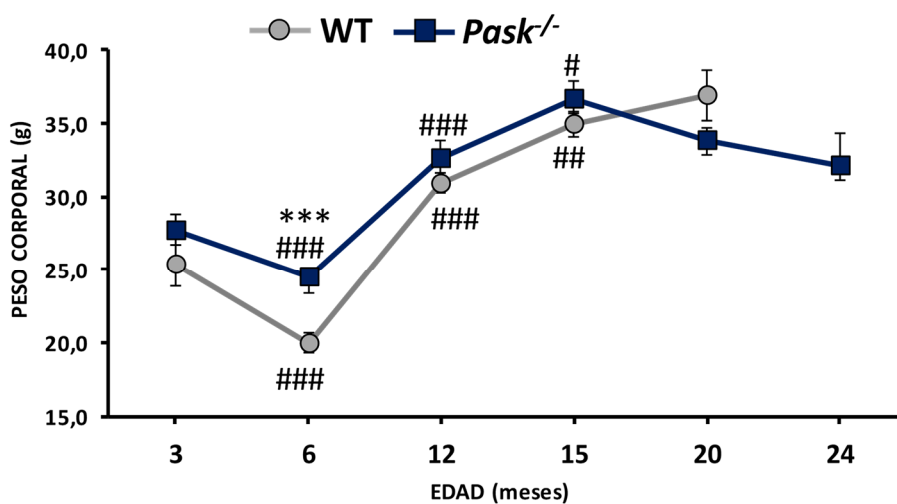
Edad (meses)	Concentración plasmática de Insulina (ng/mL)	
	WT	<i>Pask</i> <sup>-/-</sup>
3-5	0,84 ± 0,11	1,13 ± 0,12
18-20	3,91 ± 0,12 <sup>***</sup>	1,81 ± 0,05 <sup>•***</sup>

**Tabla 12. Efectos de la deficiencia de PASK en el envejecimiento en la concentración plasmática de insulina.**

Las concentraciones de insulina (ng/mL) en plasma de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 y 18-20 meses de edad se midieron mediante un ELISA. La tabla muestra los valores medios ± SEM de las concentraciones plasmáticas de insulina; n=4-5 animales por condición. •,  $P < 0,05$ , \*\*\*,  $P < 0,001$  3-5 meses vs. 18-20 meses; \*\*,  $P < 0,001$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>.

### 3.3. Los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> viejos tienden a disminuir su peso corporal y muestran mejor perfil lipídico

El envejecimiento suele estar asociado a la alteración en la masa corporal. Por ello, analizamos el peso corporal (g) de ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup>, a distintas edades (desde los 3 a los 24 meses).



**Figura 39. Pesos corporales a distintas edades.**

El peso corporal (expresado en gramos) fue registrado en ratones de tipo silvestres (WT) y deficientes en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de distintas edades (desde los 3 a los 24 meses). El gráfico de líneas representa los valores medios ± SEM del peso corporal; n= 9-10 animales por condición. #,  $P < 0,05$  12 meses vs. 15 meses, ##,  $P < 0,01$  12 meses vs. 15 meses, ###,  $P < 0,001$  3 meses vs. 6 meses, 6 meses vs. 12 meses; \*\*\*,  $P < 0,001$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>.



De este modo, se observó que, en ambos tipos de ratones, a los 6 meses de edad disminuyeron de peso corporal, siendo significativamente mayor en *Pask*<sup>-/-</sup>. Sin embargo, a partir de las siguientes edades, el peso corporal fue paulatinamente incrementando. Asimismo, según el gráfico pareció que los ratones WT siguieron aumentando de peso a edades más avanzadas, al contrario que en los *Pask*<sup>-/-</sup>, que tendieron a disminuirlo (**Figura 39**).

Aparte del peso corporal, se midieron algunos parámetros lipídicos como el colesterol total (CT), colesterol asociado a HDL (Lipoproteínas de alta densidad, C-HDL) y LDL (Lipoproteínas de baja densidad, C-LDL) y triglicéridos (TG), en plasma de ratones de 3-5 y 18-20 meses de edad. Nuestros datos mostraron que todos los parámetros lipídicos estudiados apenas variaron con la edad en los ratones WT. Mientras que, en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> envejecidos disminuyó significativamente el nivel plasmático del colesterol total, los triglicéridos y el C-HDL (**Tabla 13**). Además, los ratones de 18-20 meses deficientes en PASK mostraron niveles más bajos de la mayoría de los parámetros lipídicos analizados, con respecto a WT de la misma edad (**Tabla13**).

			CT (mg/dL)	TG (mg/dL)	C-HDL (mg/dL)	C-LDL (mg/dL)
Edad (meses)	3-5	WT	95,25 ± 7,03	146,50 ± 25,00	61,00 ± 4,94	8,00 ± 1,70
		<i>Pask</i> <sup>-/-</sup>	97,50 ± 5,20	115,50 ± 12,60	64,00 ± 6,27	10,25 ± 3,20
	18-20	WT	92,33 ± 4,00	121,14 ± 11,50	53,86 ± 4,72	11,29 ± 2,78
		<i>Pask</i> <sup>-/-</sup>	70,57 ± 4,40 <sup>••**</sup>	82,71 ± 4,38 <sup>•**</sup>	40,50 ± 4,50 <sup>•</sup>	16,57 ± 1,74

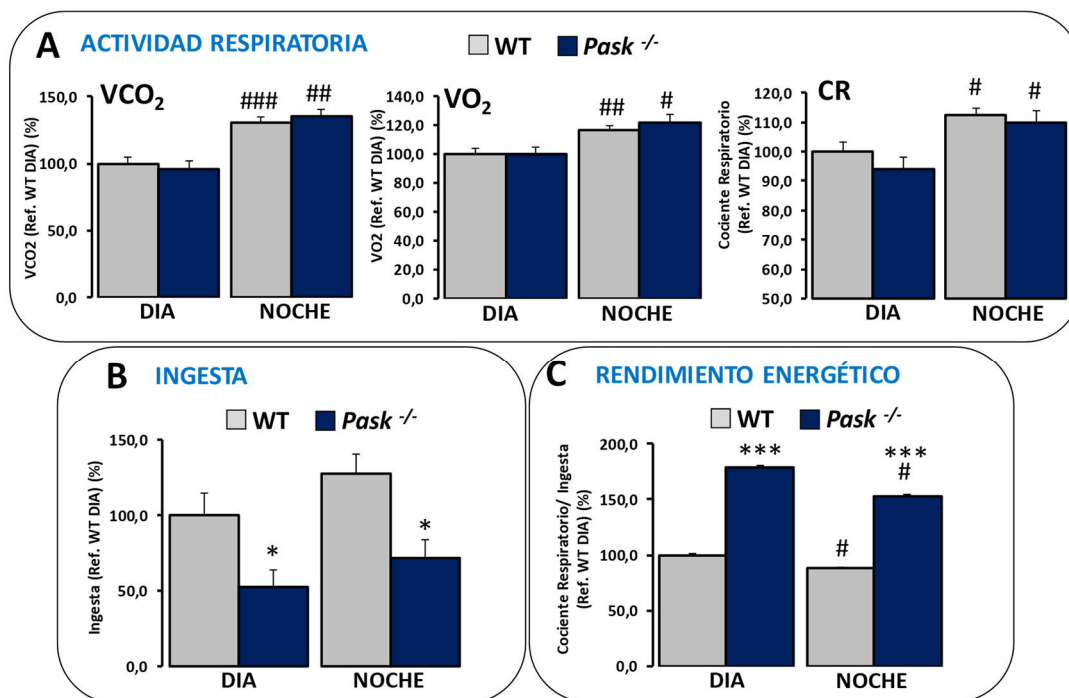
**Tabla 13. Efectos del envejecimiento y de la deficiencia en PASK sobre algunos parámetros lipídicos.**

Se analizaron el colesterol total (CT), el colesterol asociado a HDL (Lipoproteínas de alta densidad, C-HDL), o LDL (Lipoproteínas de baja densidad, C-LDL) y los triglicéridos (TG), en plasma de ratones de 3-5 y 18-20 meses de edad de tipo silvestres (WT) y deficientes en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>). Los resultados fueron expresados como mg/dL. La tabla muestra los valores medios ± SEM; n=4-5 animales por condición. •, *P*<0,05, ••, *P*<0,01 3-5 meses vs. 18-20 meses; \*\*, *P*<0,01 WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>.

### 3.4. Los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> muestran un elevado rendimiento energético

La actividad metabólica fue analizada en ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup> de 9 meses de edad, a lo largo de 3 días consecutivos. Para ello, se estudiaron varios parámetros: la actividad respiratoria, registrando la producción de CO<sub>2</sub> (VCO<sub>2</sub>), el consumo de O<sub>2</sub> (VO<sub>2</sub>) y el cociente respiratorio (VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>).

Nuestros resultados indicaron que los ratones WT mostraron un cociente respiratorio (VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>) mayor durante la noche, como era de esperar, pues los roedores tienen los ciclos circadianos invertidos, con respecto a los humanos, siendo su actividad metabólica máxima durante las horas nocturnas. Además, los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> se comportaron de manera similar a los WT (Figura 40A).



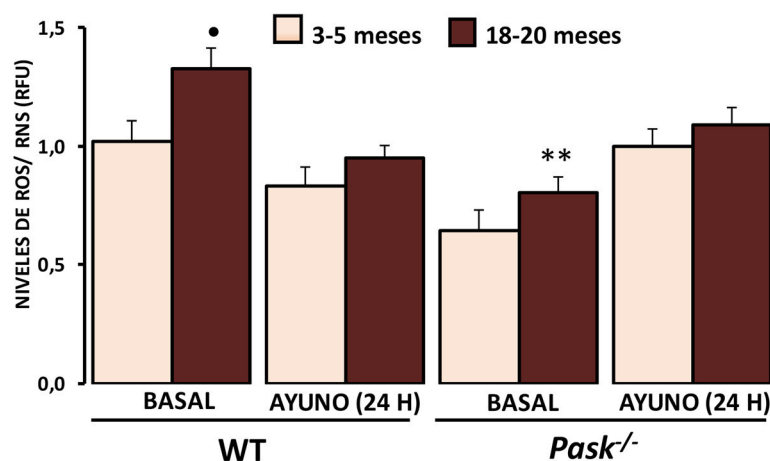
**Figura 40. Efectos de la deficiencia de PASK en la actividad metabólica.**

Se analizaron varios parámetros de la actividad respiratoria (A), registrando la producción de CO<sub>2</sub> (VCO<sub>2</sub>), el consumo de O<sub>2</sub> (VO<sub>2</sub>) y el cociente respiratorio (VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>); la ingesta de comida (B) y el rendimiento energético (C), calculado como el ratio entre el cociente respiratorio y la ingesta, en ratones de tipo silvestres (WT) y deficientes en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 9 meses de edad. Los datos fueron recogidos durante 3 días consecutivos y a cada hora, considerándose el horario de DIA entre las 8:00 am y 20:00 pm horas (DIA) y de NOCHE entre las 20:00 pm y 8:00 am (NOCHE). Los datos obtenidos en WT DIA fueron considerados como 100 %. Las barras de los gráficos representan las medias  $\pm$  SEM; n= 9 animales de cada tipo. \*,*P*<0,05, \*\*\*,*P*<0,001 WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; #,*P*<0,05, ##,*P*<0,01, ###,*P*<0,001 DIA vs. NOCHE.

Finalmente, se determinó el rendimiento energético, definido como el ratio que había entre el cociente respiratorio (CR) y la ingesta. De este modo, los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> mostraron un mayor rendimiento energético, con respecto a WT, tanto por el DIA ( $26,29 \pm 0,34$  % vs.  $14,77 \pm 0,49$  %) como por la NOCHE ( $22,52 \pm 0,90$  % vs.  $13,04 \pm 0,34$  %) (**Figura 40C**). Esta diferencia vino determinada principalmente porque, aunque el cociente respiratorio fue similar entre WT y *Pask*<sup>-/-</sup> (**Figura 40A**), la ingesta fue siempre menor en los ratones deficientes en PASK (**Figura 40B**), por lo cual el rendimiento energético estaba incrementado (**Figura 40C**).

### 3.5. Los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> viejos mantienen bajos los niveles de ROS en rangos similares a los WT jóvenes

El envejecimiento se caracteriza por el aumento del estrés oxidativo, la alteración en los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes y la disfunción mitocondrial; afectando seriamente a la homeostasis redox celular.



**Figura 41. Efectos del envejecimiento y de la deficiencia en PASK en el contenido hepático de ROS/RNS.**

Los niveles de ROS/RNS fueron medidos en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 24 horas (AYUNO 24 H), en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 y 18-20 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 24 horas (AYUNO 24 H). El valor obtenido en los ratones WT 3-5 meses BASAL fue considerado como 1. Las barras del gráfico representan las medias  $\pm$  SEM; n= 4-5 animales por condición. •,  $P < 0,05$  3-5 meses vs. 18-20 meses; \*\*,  $P < 0,01$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>.

Nuestros resultados indicaron que los ratones WT de 18-20 meses de edad elevaron un  $32,50 \pm 9,00$  % la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS/RNS). En cambio, los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> aunque también incrementaban los niveles de ROS con la edad, éstos no alcanzaban siquiera los niveles producidos en WT de 3-5 meses de edad (**Figura 41**).

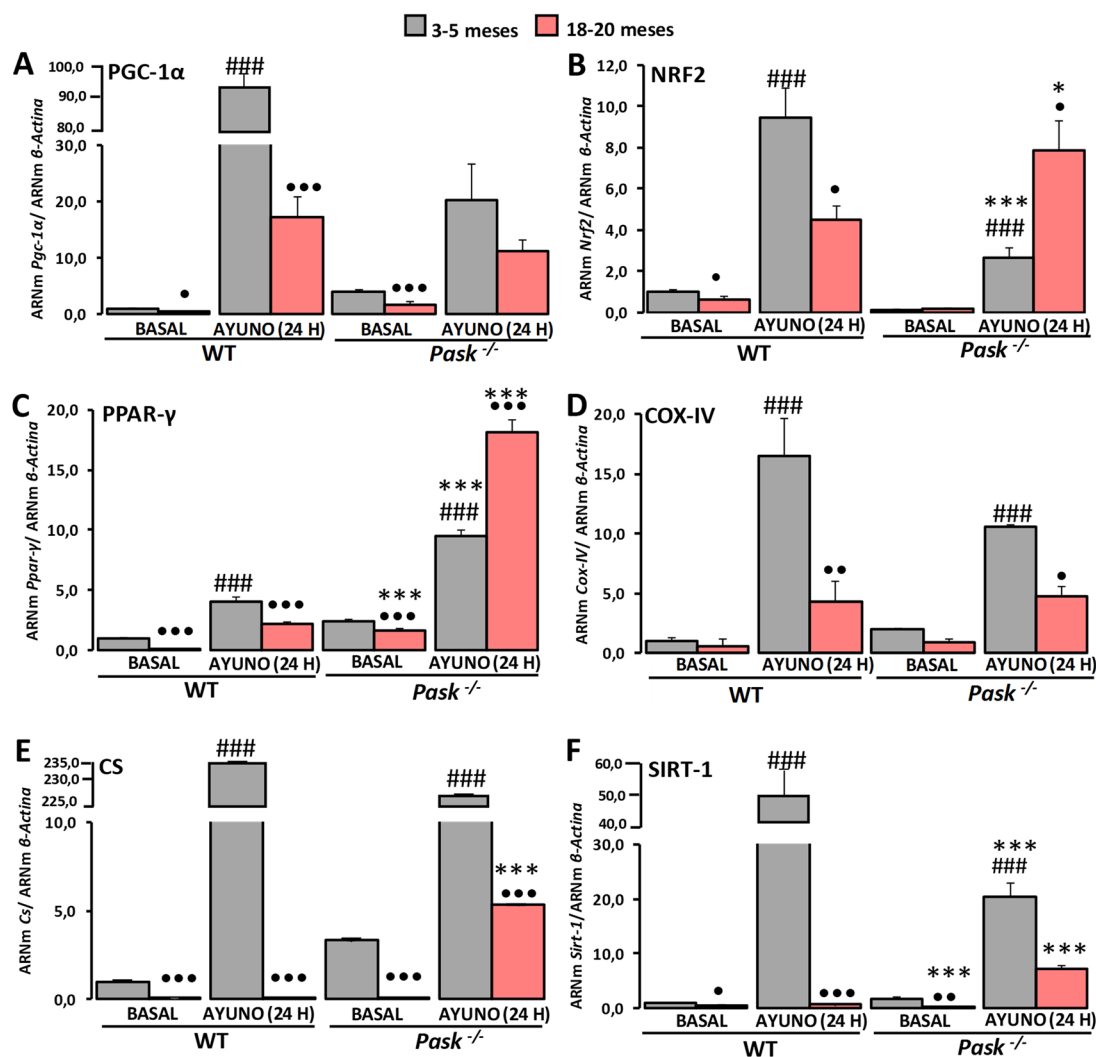
### **3.6. La expresión hepática de varios genes implicados en la biogénesis y la función mitocondrial, y el contenido de ADN mitocondrial están alterados en el proceso de envejecimiento**

El mantenimiento de la función mitocondrial y la homeostasis energética se ven altamente afectadas durante el envejecimiento.

Por ello, se analizó la expresión del ARNm de *Pgc-1 $\alpha$*  y de algunos factores de transcripción regulados por PGC-1 $\alpha$  (NRF2, PPAR- $\gamma$ ). Además, se estudió la expresión génica de algunas enzimas mitocondriales como la COX-IV y CS, y de la enzima desacetilasa SIRT-1, pues ésta regula la actividad del coactivador PGC-1 $\alpha$ .

Nuestros datos indicaron que, en general, la expresión de estos genes aumentó en condiciones de ayuno de 24 horas, como ya estaba descrito en ayuno de 48 horas (**ver apartado 1.6.**), tanto en los ratones WT como *Pask*<sup>-/-</sup> de 3-5 meses de edad (**Figura 42A, B, C, D, E, F**).

Por otra parte, en los ratones WT de 18-20 meses, se produjo una inhibición generalizada de la expresión de los genes estudiados, tanto en situación basal, como en ayuno (**Figura 42A, B, C, E, F**). Sin embargo, en los ratones deficientes en PASK esta inhibición se produjo en estado basal, pero, no siempre en ayuno (**Figura 42A, F**). Así, la deficiencia de PASK hizo que en los ratones envejecidos ayunados se produjera una sobreexpresión de los genes *Nrf2* y *Ppar- $\gamma$* , en lugar de la inhibición, tal como ocurría en los WT envejecidos (**Figura 42B, C**).



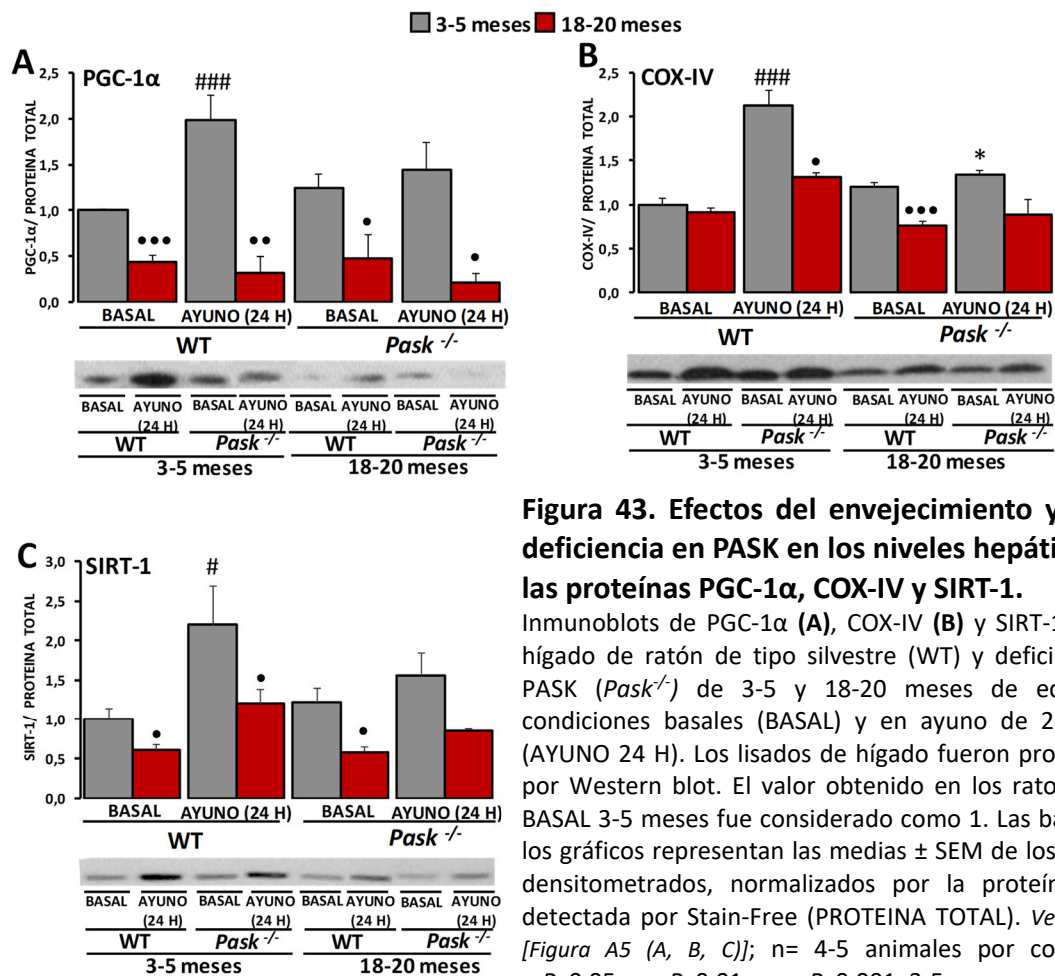
**Figura 42. Efectos del envejecimiento y de la deficiencia en PASK en la expresión de varios genes hepáticos implicados en la biogénesis y función mitocondrial.**

La expresión génica de *Pgc-1α* (A), *Nrf2* (B), *Ppar-γ* (C), *Cox-IV* (D), *Cs* (E) y *Sirt-1* (F) fue analizada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Los niveles del ARNm fueron medidos en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 y 18-20 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 24 horas (AYUNO (24 H)). El valor obtenido en los ratones WT BASAL 3-5 meses fue considerado como 1. Las barras de los gráficos representan las medias ± SEM de los niveles de expresión, normalizados por el ARNm de la  $\beta$ -Actina, utilizado como gen control; n= 4-5 animales por condición. •,  $P < 0,05$ , ••,  $P < 0,01$ , •••,  $P < 0,001$  3-5 meses vs. 18-20 meses; \*,  $P < 0,05$ , \*\*\*,  $P < 0,001$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; ###,  $P < 0,001$  BASAL vs. AYUNO 24 H.

También, se determinó el contenido de ADNmt en ambos tipos de ratones. El ayuno no elevó el contenido de ADN mitocondrial en los ratones WT envejecidos (disminuyó ~12 veces), a diferencia de los *Pask*<sup>-/-</sup>. Sin embargo, en condiciones basales, el contenido de ADNmt en WT aumentó considerablemente durante el envejecimiento (~4 veces), mientras que en *Pask*<sup>-/-</sup> apenas fue detectado.

### 3.7. Los niveles proteicos de PGC-1 $\alpha$ , COX-IV y SIRT-1 se encuentran alterados en los ratones envejecidos, pero en menor medida en los ratones deficientes en PASK, bajo condiciones de ayuno

Se analizaron los niveles proteicos de PGC-1 $\alpha$ , COX-IV y SIRT-1 en hígado de ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup>, de 3-5 y 18-20 meses de edad.



**Figura 43. Efectos del envejecimiento y de la deficiencia en PASK en los niveles hepáticos de las proteínas PGC-1 $\alpha$ , COX-IV y SIRT-1.**

Inmunoblots de PGC-1 $\alpha$  (A), COX-IV (B) y SIRT-1 (C) en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 y 18-20 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 24 horas (AYUNO 24 H). Los lisados de hígado fueron procesados por Western blot. El valor obtenido en los ratones WT BASAL 3-5 meses fue considerado como 1. Las barras de los gráficos representan las medias  $\pm$  SEM de los valores densitometrados, normalizados por la proteína total detectada por Stain-Free (PROTEINA TOTAL). Ver Anexos [Figura A5 (A, B, C)]; n= 4-5 animales por condición. •,  $P < 0,05$ , ••,  $P < 0,01$ , •••,  $P < 0,001$  3-5 meses vs. 18-20 meses; \*,  $P < 0,05$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; #,  $P < 0,05$ , ###,  $P < 0,001$  BASAL vs. AYUNO 24 H.

El ayuno de 24 horas aumentó los niveles de las proteínas PGC-1 $\alpha$ , COX-IV y SIRT-1 en los ratones WT de 3-5 meses de edad, como ya estaba descrito en ayuno de 48 horas (ver apartados 1.7. y 1.8.). Sin embargo, a esta edad los ratones deficientes en PASK no mostraron esa estimulación, en respuesta al ayuno (24 horas) (Figura 43A, B, C). Además, nuestros datos indicaron que los ratones de mayor edad (18-20 meses) poseían, en general,

menores niveles hepáticos de las proteínas PGC-1 $\alpha$ , COX-IV y SIRT-1, respecto a los jóvenes, tanto en WT como en *Pask*<sup>-/-</sup>. Sin embargo, la disminución en los ratones envejecidos deficientes en PASK fue menor (en el caso de la situación de ayuno), puesto que ya partían de menor cantidad de proteína que los WT (Figura 43A, B, C).

### 3.8. Los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> viejos disminuyen menos la expresión de las enzimas antioxidantes, que desciende con la edad

Se analizó la expresión génica de las enzimas antioxidantes: SOD-Mn, SOD-Cu/Zn, GPx y CAT, en ratones de 18-20 meses de edad.

Enzima antioxidante	Estado nutricional	Descenso de expresión (%) en ratones envejecidos	
		WT	<i>Pask</i> <sup>-/-</sup>
SOD-Mn	BASAL	90 $\pm$ 4 <sup>•••</sup>	77 $\pm$ 6 <sup>••••</sup>
	AYUNO (24 H)	89 $\pm$ 1 <sup>•••</sup>	90 $\pm$ 2 <sup>•••</sup>
SOD-Cu/Zn	BASAL	66 $\pm$ 3 <sup>•••</sup>	15 $\pm$ 1 <sup>•••••</sup>
	AYUNO (24 H)	61 $\pm$ 3 <sup>•</sup>	7 $\pm$ 2 <sup>***</sup>
CAT	BASAL	97 $\pm$ 4 <sup>•••</sup>	38 $\pm$ 10 <sup>•••••</sup>
	AYUNO (24 H)	82 $\pm$ 7 <sup>•••</sup>	86 $\pm$ 8 <sup>•••</sup>
GPx	BASAL	92 $\pm$ 9 <sup>•••</sup>	93 $\pm$ 10 <sup>•••</sup>
	AYUNO (24 H)	98 $\pm$ 1 <sup>•••</sup>	90 $\pm$ 2 <sup>•••••</sup>

**Tabla 14. Efecto del envejecimiento sobre la expresión génica de las enzimas antioxidantes.**

Los niveles de expresión de los genes *Sod-Mn*, *Sod-Cu/Zn*, *Cat* y *Gpx* fueron determinados en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 y 18-20 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 24 horas (AYUNO 24 H). La tabla muestra los valores medios  $\pm$  SEM del descenso de expresión de las enzimas antioxidantes en el proceso de envejecimiento, expresado en porcentaje; n= 4-5 animales por condición. •,  $P < 0,05$ ; •••,  $P < 0,001$  3-5 meses vs. 18-20 meses; \*\*\*,  $P < 0,001$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>.

La expresión de todas las enzimas antioxidantes disminuyó significativamente a los 18-20 meses de edad, pero esta disminución fue menor, en algunas condiciones, en los ratones deficientes en PASK, con respecto a los WT (**Tabla 14**).

### **3.9. La deficiencia de PASK aumenta los niveles proteicos de NRF2 y la expresión hepática de *Ho-1*, *Gclc* y *Gclm* en los ratones envejecidos**

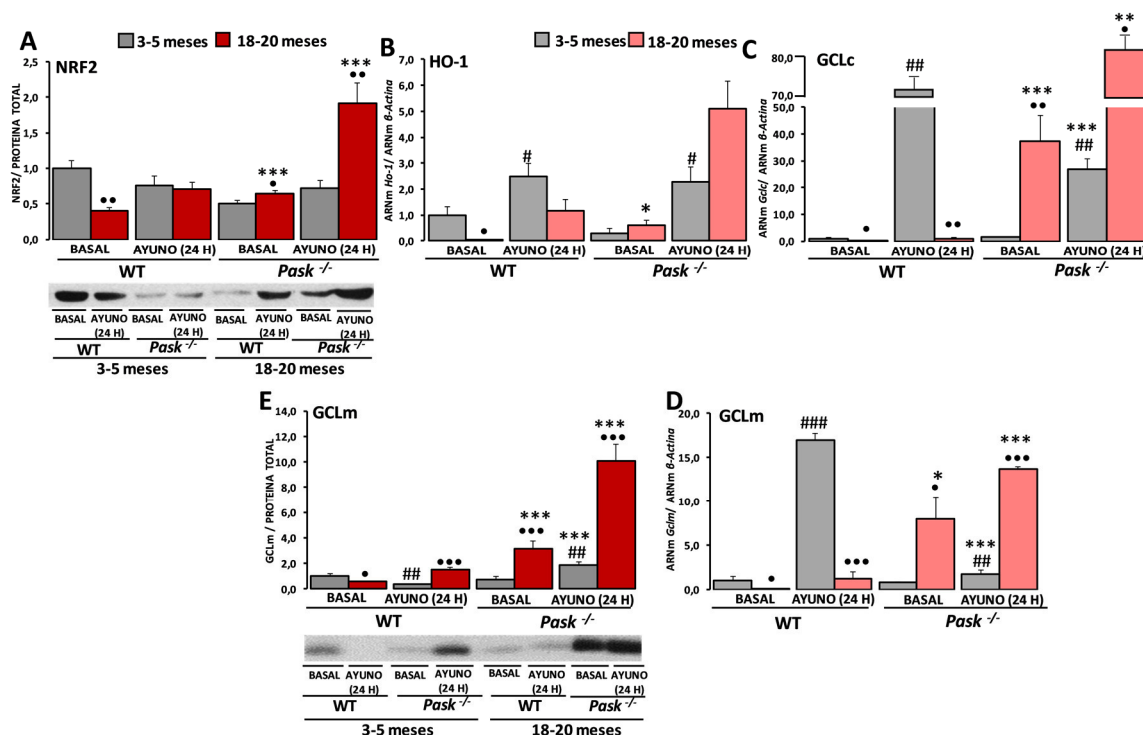
NRF2 es uno de los más importantes reguladores de la defensa frente al estrés oxidativo, pues controla la expresión de diversas enzimas antioxidantes como la HO-1, la GCLc y GCLm.

Se estudiaron los niveles proteicos de NRF2 y la expresión del ARNm de *Ho-1*, *Gclc* y *Gclm* en hígado de ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup>, de 3-5 y 18-20 meses de edad.

Nuestros datos indicaron que los niveles basales de la proteína NRF2 y la expresión del ARNm de *Ho-1*, *Gclc* y *Gclm* disminuyeron en los ratones WT de 18-20 meses de edad, respecto a los jóvenes (**Figura 44A, B, C, D**). En cambio, esta disminución asociada a la edad, no se producía en los ratones deficientes en PASK. Al contrario, los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> envejecidos mostraban aumentados los niveles proteicos de NRF2 y el ARNm de *Ho-1*, *Gclc* y *Gclm*, respecto a los jóvenes, incluso en la mayoría de los casos, por encima de los WT jóvenes (**Figura 44A, B, C, D**). Esto podría indicar que la pérdida de la respuesta antioxidante en los ratones envejecidos estaba controlada por la presencia de PASK. De este modo, la deficiencia de PASK potenciaba NRF2, y por consiguiente sus genes diana cuando se avanzaba en edad (18-20 meses), con el fin de eliminar el exceso de las especies reactivas y regular el estado redox celular. También, hay que destacar que el ayuno de 24 horas en los ratones WT de 3-5 meses de edad aumentó significativamente la expresión hepática de *Ho-1* ~2 veces (**Figura 44B**), *Gclc* ~50 veces (**Figura 44C**) y *Gclm* ~15 veces (**Figura 44D**), siendo considerablemente mayor, con respecto a los ratones *Pask*<sup>-/-</sup>. Sin embargo, los niveles de la



proteína GCLm no fueron concordantes con su expresión, pues disminuían radicalmente en los ratones WT ayunados (24 horas), pudiéndose deber a modificaciones post-transcripcionales (Figura 44D, E).



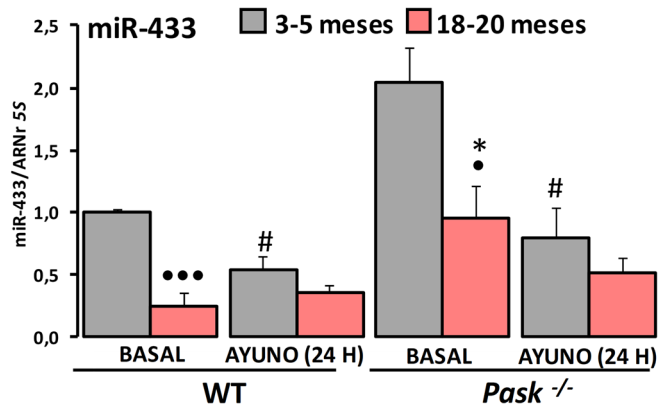
**Figura 44. Efectos del envejecimiento y de la deficiencia en PASK en la expresión hepática de la proteína NRF2 y los genes *Ho-1*, *Gclc* y *Gclm*.**

Inmunoblots de NRF2 (A) y GCLm (E) en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 y 18-20 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 24 horas (AYUNO 24 H). Los lisados de hígado fueron procesados mediante Western blot. La expresión de los genes *Ho-1* (B), *Gclc* (C) y *Gclm* (D) fue analizada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), en hígado de ratón WT y *Pask*<sup>-/-</sup>. El valor obtenido en los ratones WT BASAL 3-5 meses fue considerado como 1. Las barras de los gráficos en A y E representan las medias ± SEM de los valores densitometrados, normalizados por la proteína total detectada por Stain-Free (PROTEINA TOTAL). Ver Anexos [Figura A5 (D, E)]; B, C y D representan las medias ± SEM de los niveles de expresión, normalizados por el ARNm de la  $\beta$ -Actina, utilizado como gen control; n= 4-5 animales por condición. •,  $P < 0,05$ , ••,  $P < 0,01$ , •••,  $P < 0,001$  3-5 meses vs. 18-20 meses; \*,  $P < 0,05$ , \*\*,  $P < 0,01$ , \*\*\*,  $P < 0,001$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; #,  $P < 0,05$ , ##,  $P < 0,01$ , ###,  $P < 0,001$  BASAL vs. AYUNO 24 H.

### 3.10. La expresión basal del miR-433 está alterada en el proceso de envejecimiento

Como los cambios en la expresión y la proteína de GCLm no eran concordantes, se decidió analizar la expresión del miR-433, pues éste se encontraba implicado en el control del estado redox celular.

De este modo, la expresión hepática del miR-433 se vio alterada significativamente en el proceso de envejecimiento, disminuyendo la expresión basal ~5 veces en los ratones WT de 18-20 meses de edad, mientras que en *Pask*<sup>-/-</sup> fueron apenas ~2 veces, sin embargo, en ayuno no se observaron diferencias (**Figura 45**).



**Figura 45. Efectos del envejecimiento y de la deficiencia en PASK en la expresión hepática del miR-433.**

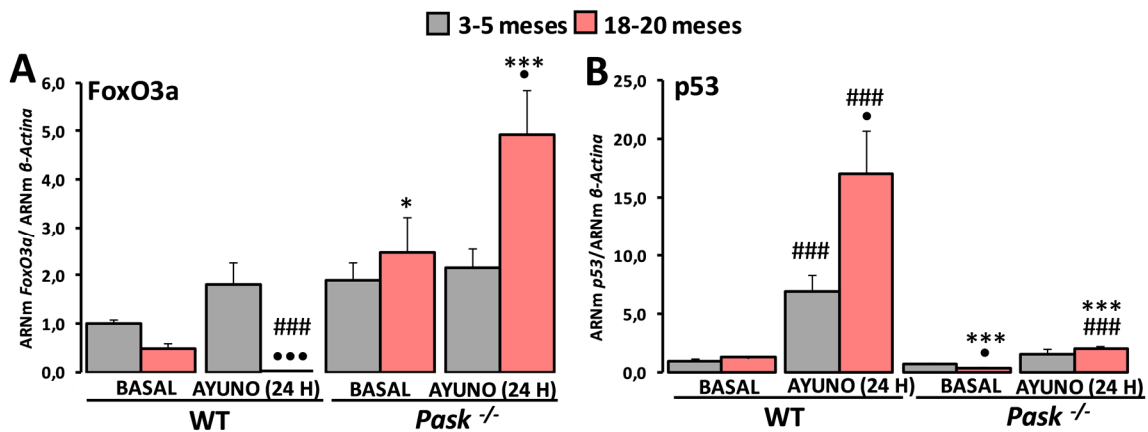
La expresión del miR-433 fue analizada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 y 18-20 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 24 horas (AYUNO 24 H). El valor obtenido en los ratones WT BASAL 3-5 meses fue considerado como 1. Las barras del gráfico representan las medias  $\pm$  SEM de los niveles de expresión, normalizados por el ARNr 5S, utilizado como gen control; n= 4-5 animales por condición. •,  $P < 0,05$ , •••,  $P < 0,001$  3-5 meses vs. 18-20 meses; \*,  $P < 0,05$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; #,  $P < 0,05$  BASAL vs. AYUNO 24 H.

### 3.11. La expresión hepática de *FoxO3a* y *p53* está modulada en el proceso de envejecimiento, siendo dependiente de PASK

Se estudió la regulación de la expresión de los factores de transcripción *FoxO3a* y *p53* en el proceso de envejecimiento. Para ello, se analizó la expresión del ARNm de *FoxO3a* y *p53* en hígado de ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup>, de 3-5 y 18-20 meses de edad.

Nuestros resultados indicaron que el ayuno de 24 horas tendió a aumentar la expresión hepática de *FoxO3a* y *p53* en los ratones WT de 3-5 meses de edad (**Figura 46A**,

**B)**, tal y como habíamos visto a las 48 horas (**ver apartado 1.9.**). Sin embargo, la expresión hepática de *FoxO3a* disminuyó en los ratones WT de 18-20 meses de edad, especialmente en los ratones ayunados, en cambio, la deficiencia de PASK aumentó su expresión en todas las condiciones (ayuno y basal) (**Figura 46A**). La expresión génica de *p53* estaba aumentada en los ratones WT envejecidos ayunados, respecto a los jóvenes (~17 veces), pero en los *Pask*<sup>-/-</sup> apenas hubo diferencias (**Figura 46B**). Por tanto, el ayuno de 24 horas durante el envejecimiento aumentó la expresión de *p53*, pero disminuyó radicalmente *FoxO3a* (**Figura 46A, B**).



**Figura 46. Efectos del envejecimiento y de la deficiencia en PASK en la expresión hepática de *FoxO3a* y *p53*.**

La expresión génica de *FoxO3a* (**A**) y *p53* (**B**) fue analizada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Los niveles del ARNm fueron medidos en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 y 18-20 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 24 horas (AYUNO 24 H). El valor obtenido en los ratones WT BASAL 3-5 meses fue considerado como 1. Las barras de los gráficos representan las medias  $\pm$  SEM de los niveles de expresión, normalizados por el ARNm de la  $\beta$ -Actina, utilizado como gen control; n= 4-5 animales por condición. •,  $P < 0,05$ , •••,  $P < 0,001$  3-5 meses vs. 18-20 meses; \*,  $P < 0,05$  \*\*\*,  $P < 0,001$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; ###,  $P < 0,001$  BASAL vs. AYUNO 24 H.

### 3.12. Los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> viejos muestran alterados los niveles de las proteínas Akt activada, p53 y PCNA, implicadas en mecanismos apoptóticos, supervivencia celular y de reparación del ADN

Se ha visto que la proteína quinasa Akt juega un papel fundamental en el proceso de envejecimiento mediante su implicación en el metabolismo energético. Cabe destacar que,

además, en condiciones con un elevado estrés oxidativo, la proteína Akt se sobreactiva, pudiendo promover, aparte de la supervivencia celular, la senescencia celular, ya que aumenta la estabilidad de la proteína p53, favoreciendo la interrupción del ciclo celular, y la apoptosis (Kim et al., 2017).

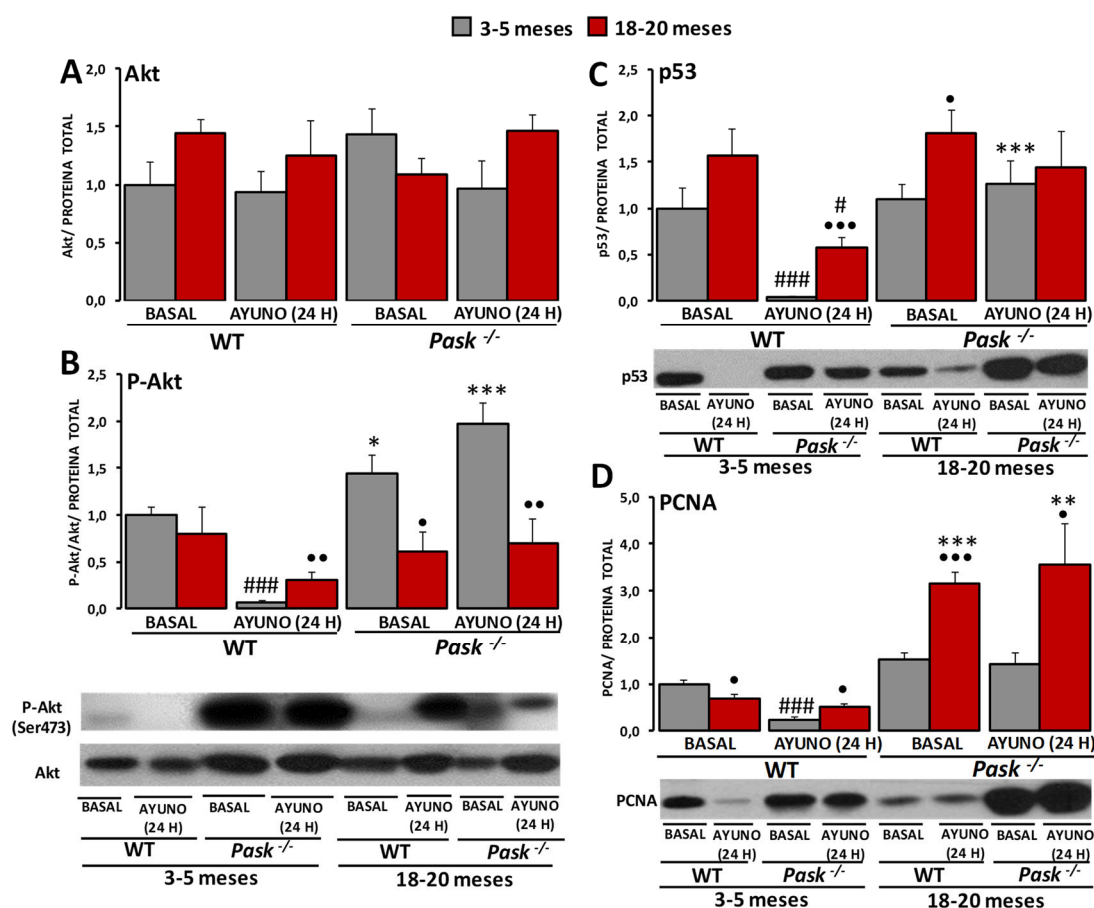
Nuestros resultados indicaron que el nivel total de la proteína Akt no se vio alterado ni en el envejecimiento ni por la deficiencia de PASK, siendo similar en todas las condiciones analizadas (basal y ayuno) (**Figura 47A**).

El estado de activación de Akt fue detectado con anti-fosfo-Akt (Ser473). De tal modo, que el grado de activación de Akt y los niveles proteicos de p53 disminuyeron significativamente en el ayuno de 24 horas, en los ratones WT de 3-5 meses de edad, siendo inferiores, con respecto a los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> (**Figura 47B, C**). Sin embargo, la deficiencia de PASK mantuvo a la Akt sobreactivada en todas las condiciones analizadas, perdiéndose el efecto observado en los WT ayunados y, además, el efecto del ayuno en p53, como ya estaba descrito en ayuno de 48 horas (**ver apartados 1.11. y 1.13.**). En cambio, los ratones WT ayunados viejos (18-20 meses) mostraron mayor cantidad de Akt activada y de proteína p53 (**Figura 47B, C**), pero, la deficiencia de PASK en el envejecimiento disminuyó los niveles de fosfo-Akt (Ser473) en ambas condiciones (basal y ayuno) (**Figura 47B**), mientras que, p53 tendió a aumentar en estado basal (**Figura 47C**).

Además, se analizó la proteína PCNA, ya que está implicada en los procesos de reparación y replicación del ADN.

El ayuno de 24 horas disminuyó los niveles de la proteína PCNA en los ratones WT de 3-5 meses de edad, pero esto mismo no sucedió en *Pask*<sup>-/-</sup> (**Figura 47D**), tal y como habíamos visto a las 48 horas (**ver apartado 1.14.**).

Los niveles basales de la proteína PCNA disminuyeron en los ratones WT envejecidos, en cambio, en el ayuno mostraron mayores cantidades de PCNA, con respecto a los ratones jóvenes ayunados. Además, la deficiencia de PASK en el envejecimiento elevó los niveles de la proteína PCNA en ambas condiciones (basal y ayuno) (**Figura 47D**).



**Figura 47. Efectos del envejecimiento y de la deficiencia de PASK en los niveles hepáticos de las proteínas Akt, p53 y PCNA.**

Inmunoblots de la proteína total Akt (**A**), fosfo-Akt (Ser473) (P-Akt) (**B**), p53 (**C**) y PCNA (**D**) en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 y 18-20 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 24 horas (AYUNO 24 H). Los lisados de hígado fueron procesados por Western blot. El valor obtenido en los ratones WT BASAL 3-5 meses fue considerado como 1. Las barras de los gráficos representan las medias  $\pm$  SEM de los valores densitometrados, normalizados por la proteína total detectada por Stain-Free (PROTEINA TOTAL). Ver Anexos [Figura A6 (A, B, C, D)]; n= 4-5 animales por condición. •,  $P<0,05$ , ••,  $P<0,01$ , •••,  $P<0,001$  3-5 meses vs. 18-20 meses; \*,  $P<0,05$ , \*\*,  $P<0,01$ , \*\*\*,  $P<0,001$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>; #,  $P<0,05$ , ###,  $P<0,001$  BASAL vs. AYUNO 24 H.

## 4. EFECTOS DEL GLP-1 EN EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO

### 4.1. Los niveles endógenos de GLP-1 disminuyen en el proceso de envejecimiento

Se analizaron las concentraciones de GLP-1 (pM) en plasma de ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup>, de 3-5 y 18-20 meses de edad.

Nuestros resultados indicaron que los ratones WT de 18-20 meses de edad mostraban ~4 veces menos de concentración plasmática de GLP-1, con respecto a los jóvenes (**Tabla 15**). Asimismo, los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> de 3-5 meses de edad, presentaban niveles endógenos de GLP-1 inferiores a los WT de la misma edad, siendo incluso más bajos que en los WT envejecidos (**Tabla 15**).

Edad (meses)	Concentración plasmática de GLP-1 (pM)	
	WT	<i>Pask</i> <sup>-/-</sup>
3-5	4,13 ± 1,15	0,74 ± 0,17*
18-20	1,05 ± 0,42*	0,40 ± 0,12

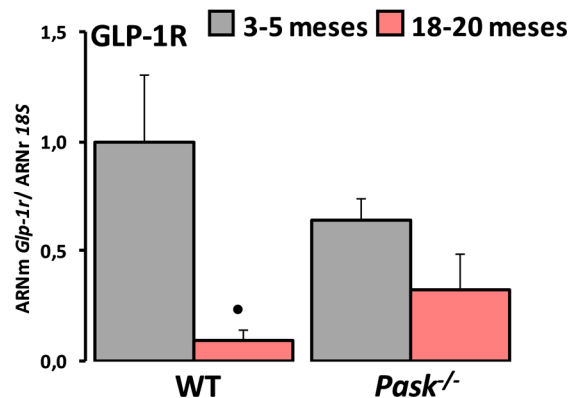
**Tabla 15. Efectos del envejecimiento y de la deficiencia de PASK en la concentración plasmática de GLP-1.**

Las concentraciones de GLP-1 (pM) en plasma de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>), de 3-5 y 18-20 meses de edad se midieron mediante un ELISA. La tabla muestra los valores medios ± SEM de las concentraciones plasmáticas de GLP-1; n= 4-5 animales por condición. •, *P*<0,05 3-5 meses vs. 18-20 meses; \*, *P*<0,05 WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>.

### 4.2. La expresión hepática del receptor del GLP-1 se suprime en el proceso de envejecimiento

Se analizó la expresión del ARNm del receptor del GLP-1 (GLP-1R) en hígado de ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup>, de 3-5 y 18-20 meses de edad.

La expresión del ARNm de *Glp-1r*, en condiciones basales, disminuyó significativamente en WT de 18-20 meses de edad. En cambio, el efecto no fue tan drástico en los ratones deficientes en PASK, con respecto a los de 3-5 meses de edad (**Figura 48**). Esto pudo indicar que, en el proceso de envejecimiento, la expresión génica de *Glp-1r*, en condiciones basales, dependía de la expresión de PASK funcional, ya que se observó que cuando ésta desaparecía prácticamente en los ratones viejos (18-20 meses), la expresión de *Glp-1r* se bloqueaba.



**Figura 48. El efecto del envejecimiento en la expresión hepática del gen *Glp-1r*.**

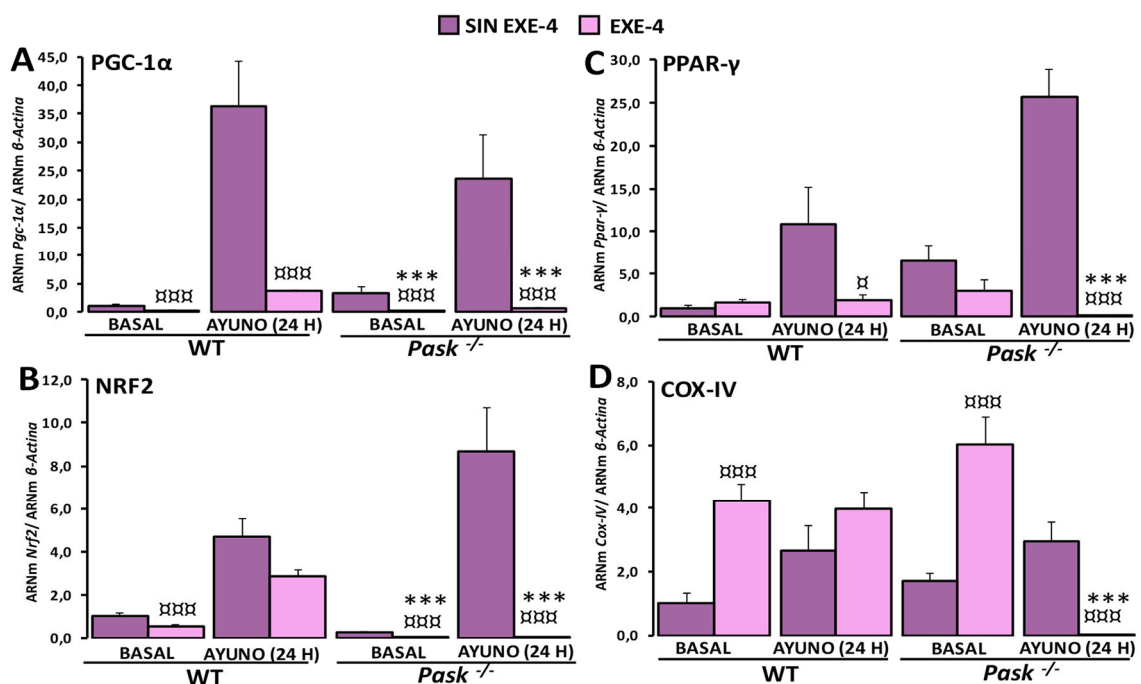
La expresión génica de *Glp-1r* fue analizada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Los niveles del ARNm fueron medidos en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 3-5 y 18-20 meses de edad, en condiciones basales. El valor obtenido en los ratones WT de 3-5 meses fue considerado como 1. Las barras del gráfico representan las medias ± SEM de los niveles de expresión, normalizados por el ARNr 18S, utilizado como gen control; n= 4-5 animales por condición. •,  $P < 0,05$  3-5 meses vs. 18-20 meses.

#### 4.3. La exendina-4 inhibe la expresión hepática de *Pgc-1α* y *Nrf2* en los ratones viejos deficientes en PASK

Se estudió el efecto que exhibía la exendina-4 sobre la expresión hepática de varios factores de transcripción implicados en la biogénesis mitocondrial como PGC-1α, NRF2,

PPAR- $\gamma$ , y la enzima mitocondrial COX-IV, en hígado de ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup>, de 18-20 meses de edad.

La exendina-4 redujo considerablemente la expresión hepática de *Pgc-1 $\alpha$* , *Nrf2*, *Ppar- $\gamma$*  en los ratones WT de 18-20 meses (Figura 49A, B, C), dependiendo del estado nutricional. Sin embargo, la exendina-4 aumentó significativamente la expresión génica de *Cox-IV*, en condición basal (Figura 49D).



**Figura 49. Efectos de la exendina-4 en la expresión de varios genes hepáticos implicados en la biogénesis y la función mitocondrial en animales envejecidos.**

La expresión génica de *Pgc-1 $\alpha$*  (A), *Nrf2* (B), *Ppar- $\gamma$*  (C) y *Cox-IV* (D) fue analizada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Los niveles del ARNm fueron medidos en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 18-20 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 24 horas (AYUNO 24 H) y en ausencia (SIN EXE-4) o presencia de exendina-4 (EXE-4) (250 ng/100 g peso). El valor obtenido en los ratones WT BASAL SIN EXE-4 fue considerado como 1. Las barras de los gráficos representan las medias  $\pm$  SEM de los niveles de expresión, normalizados por el ARNm de la  $\beta$ -Actina, utilizado como gen control; n= 4-5 animales por condición.  $\alpha$ ,  $P < 0,05$ ,  $\alpha\alpha\alpha$ ,  $P < 0,001$  SIN EXE-4 vs. EXE-4;  $\alpha\alpha\alpha$ ,  $P < 0,001$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>.



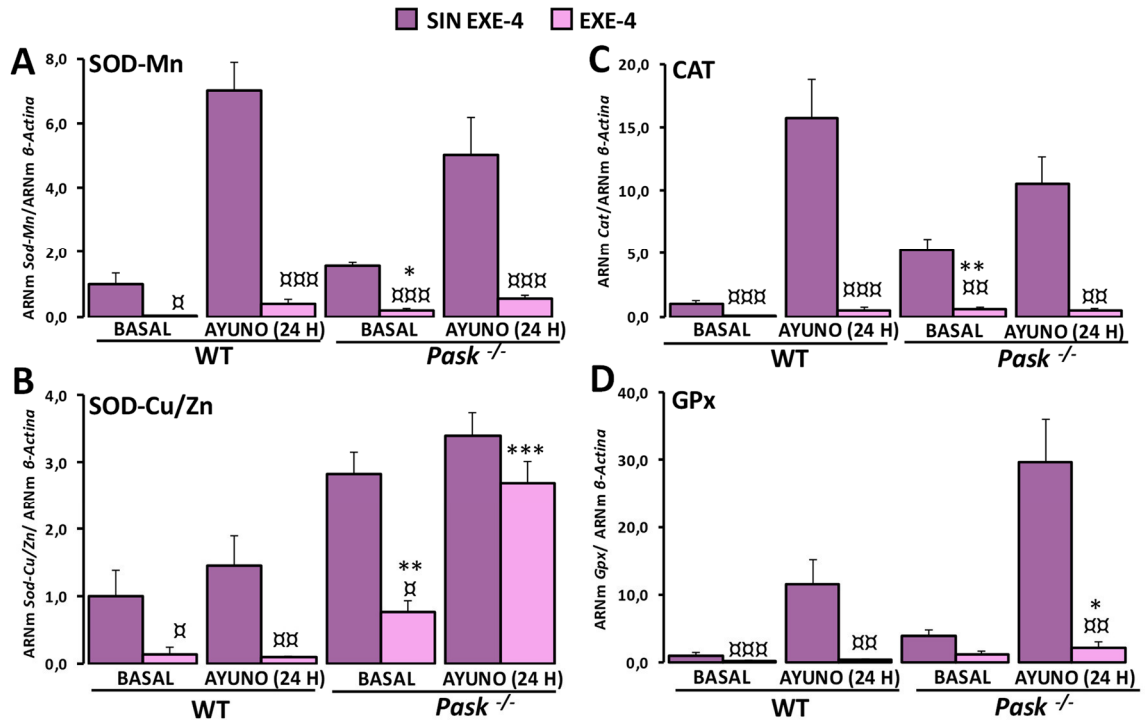
La deficiencia de PASK en el envejecimiento mantuvo, en general, los efectos que ejercía la exendina-4 sobre la expresión de estos genes en los ratones WT (**Figura 49A, B, C**), excepto en *Cox-IV*. En este caso, la exendina-4 inhibió la expresión de dicho gen en los ratones ayunados deficientes en PASK, a diferencia de los WT, donde no tuvo lugar esta inhibición (**Figura 49D**). Es decir, también en los ratones deficientes en PASK se producían las acciones inhibitorias de la exendina-4 en el proceso de envejecimiento.

#### **4.4. La exendina-4 pierde su efecto antioxidante en el proceso de envejecimiento, pero, en menor medida en los ratones deficientes en PASK**

En este punto se estudió si las acciones de la exendina-4 sobre la expresión de algunas enzimas antioxidantes analizadas en los ratones jóvenes se conservaban durante el envejecimiento.

Para ello, se analizó la expresión del ARNm de *Sod-Mn*, *Sod-Cu/Zn*, *Cat* y *Gpx*, en hígado de ratones WT y *Pask*<sup>-/-</sup>, de 18-20 meses de edad, en ausencia o presencia de exendina-4 (250 ng/100 g peso).

El tratamiento con exendina-4 (3 horas) a los 18-20 meses de edad, bloqueó casi en su totalidad la expresión de todas las enzimas antioxidantes analizadas (**Figura 50A, B, C, D**). En cambio, en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> el efecto de la exendina-4 no llegó a bloquear la expresión hepática de *Sod-Cu/Zn*, en ambas condiciones (basal y ayuno) (**Figura 50B**), y de *Gpx* en estado basal (**Figura 50D**).



**Figura 50. Efectos de la exendina-4 en la expresión del ARNm de enzimas antioxidantes en animales envejecidos.**

La expresión génica de *Sod-Mn* (A), *Sod-Cu/Zn* (B), *Cat* (C) y *Gpx* (D) fue analizada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Los niveles del ARNm fueron medidos en hígado de ratón de tipo silvestre (WT) y deficiente en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) de 18-20 meses de edad, en condiciones basales (BASAL) y en ayuno de 24 horas (AYUNO 24 H), y en ausencia (SIN EXE-4) o presencia de exendina-4 (EXE-4) (250 ng/100 g peso). El valor obtenido en los ratones WT BASAL SIN EXE-4 fue considerado como 1. Las barras de los gráficos representan las medias  $\pm$  SEM de los niveles de expresión, normalizados por el ARNm de la  $\beta$ -Actina, utilizado como gen control; n= 4-5 animales por condición.  $\alpha$ ,  $P < 0,05$ ,  $\alpha\alpha$ ,  $P < 0,01$ ,  $\alpha\alpha\alpha$ ,  $P < 0,001$  SIN EXE-4 vs. EXE-4; \*,  $P < 0,05$ , \*\*,  $P < 0,01$ , \*\*\*,  $P < 0,001$  WT vs. *Pask*<sup>-/-</sup>.







La homeostasis energética es fundamental para la supervivencia de los organismos, y por ello es primordial que su funcionamiento sea el idóneo. Para ello, son imprescindibles los sensores metabólicos, pues contribuyen a regular el balance energético y la ingesta calórica. En humanos, los sensores metabólicos se encuentran en la mayoría de los tejidos y órganos, y cualquier alteración en ellos puede desembocar en el desarrollo de enfermedades como la diabetes tipo 2.

Dos de los sensores de nutrientes más estudiados son la proteína serina/treonina quinasa dependiente de AMP (AMPK) que responde al incremento del cociente AMP/ATP intracelular y mTOR (Diana de rapamicina en mamíferos) que se activa por un incremento de la energía celular, estimulándose el crecimiento celular y la síntesis de proteínas.

De este modo, al igual que las proteínas AMPK y mTOR, la PAS quinasa actúa como un sensor de nutrientes, ya que detecta variaciones ambientales como la glucosa, el ATP o el estado redox, respondiendo al estado energético celular (Cardon and Rutter, 2012; Wenger et al., 2009).

El hígado es uno de los principales órganos encargados del mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en sangre, en respuesta al estado energético. En cambio, como consecuencia de su elevada actividad metabólica, se generan una gran cantidad de subproductos biológicamente activos denominados radicales libres como son las especies reactivas de oxígeno (ROS). Sin embargo, el hígado posee potentes sistemas de defensa como las enzimas antioxidantes, para erradicar el exceso de radicales libres (Mari et al., 2010).

La exendina-4 es un análogo sintético estructuralmente semejante al péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), pero más estable que éste *in vivo*. El GLP-1 presenta diversas funciones biológicas como la secreción postprandial de insulina o la regulación de la ingesta.

Además, está implicado en el control de la generación de especies reactivas de oxígeno y de la expresión génica de las enzimas antioxidantes (Athauda and Foltynie, 2016). De este modo, análogos del GLP-1 son empleados en el tratamiento de diversas patologías como la diabetes tipo 2 o la obesidad, por ello es primordial comprender el mecanismo de acción del GLP-1.

Los objetivos planteados en esta tesis doctoral han sido: **1)** Analizar la importancia de la PASK en la homeostasis redox del hígado. **2)** Estudiar *in vivo* la función de la PASK en el estrés oxidativo y el proceso de envejecimiento. **3)** Analizar el papel de la PASK sobre la acción reguladora de la exendina-4 en el metabolismo oxidativo y el envejecimiento.

### **1. PAPEL DE LA PASK EN LA HOMEOSTASIS REDOX DEL HÍGADO**

PASK es una proteína quinasa que detecta variaciones ambientales como la glucosa, el ATP o el estado redox, entre otros. De este modo, la PASK actuaría de forma similar a otros sensores de nutrientes ya descritos como la AMPK y mTOR (Cardon and Rutter, 2012; Wenger et al., 2009).

Estudios previos del grupo han identificado a la PASK en las áreas hipotalámicas ventromedial (VMH, centro de la saciedad) y lateral (LH, centro del hambre), implicadas en la regulación de la ingesta, donde su expresión responde a condiciones de ayuno/alimentación, y regula la actividad de los otros sensores de nutrientes (AMPK y mTOR) (Hurtado-Carneiro et al., 2013a).

Del mismo modo, conocemos que la expresión génica de *Pask* en hígado es regulada en condiciones de ayuno/alimentación (Wu et al., 2014) y que la deficiencia de PASK aumenta el cociente respiratorio en músculo esquelético (Hao et al., 2007), por lo que

sugerimos que la deficiencia de PASK podría alterar el metabolismo oxidativo y como consecuencia el contenido de ATP y ROS hepático.

Las mitocondrias son los principales productores de energía en forma de ATP mediante la fosforilación oxidativa. Para ello, se transfieren electrones mediante una serie de reacciones de óxido-reducción, a través de transportadores que constituyen la cadena de transporte electrónico (ETC). Pero, como consecuencia se generan unos subproductos biológicamente activos como las especies reactivas de oxígeno (Vakifahmetoglu-Norberg et al., 2017).

Hao y cols. describieron por primera vez que la proteína PASK actuaba como un sensor de una gran variedad de estímulos incluyendo entre otros, el estado redox (Hao et al., 2007).

En este trabajo de investigación, analizamos el papel del sensor metabólico PASK en la homeostasis redox hepática. El hígado es uno de los principales órganos implicados en el control del metabolismo oxidativo, tanto por su gran capacidad de generar radicales libres como de neutralizarlos mediante múltiples barreras de defensa (Mari et al., 2010).

Nuestros datos sugieren que los ratones deficientes en PASK (*Pask*<sup>-/-</sup>) exhiben bajo contenido de ATP hepático, en estado basal. Asimismo, la generación de ROS es menor en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup>, y además la expresión génica de las enzimas antioxidantes (SOD-Mn, CAT y GPx) está más elevada (**Figura 51**). Estudios previos demostraron que la sobreexpresión de la enzima SOD-Mn protegía parcialmente contra la resistencia a la insulina, inducida por una dieta rica en grasa (HFD) (Hoehn et al., 2009) y prevenía el desarrollo de obesidad, inducida por la intolerancia a la glucosa (Liu et al., 2013). Ello iría en consonancia con el fenotipo descrito también en los ratones deficientes en PASK (Hao et al., 2007; Pérez-García et al., en prensa).



Se podría sugerir que los niveles bajos de ATP y ROS que muestran los ratones deficientes en PASK podrían deberse a una reducción del contenido mitocondrial, pues el número de mitocondrias hepáticas es menor, con respecto a los controles. Sin embargo, el contenido de ADN mitocondrial (ADNmt), así como la expresión hepática de las enzimas mitocondriales COX-IV y CS son mayores en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup>. Estos resultados, aparentemente contradictorios podrían tener dos lecturas: o bien la producción de ATP es la consecuencia de un menor contenido y función mitocondrial; o bien el déficit de ATP es la causa de una respuesta celular, produciéndose un aumento del ADNmt y un incremento de la capacidad de la cadena respiratoria mitocondrial como mecanismo compensatorio (Moraes et al., 1989). De cualquier forma, hay que destacar que los *Pask*<sup>-/-</sup> son más eficientes energéticamente, pues hemos observado que la ingesta de alimentos es menor, pero su tasa metabólica basal no varía, con respecto a los ratones silvestres.

Diversos estudios han indicado que la restricción calórica presenta efectos beneficiosos para la salud, ya que reduce la producción de radicales libres (Mattson and Wan, 2005), en cambio, se ha visto que el ayuno prolongado podría conducir a un aumento incontrolado de radicales libres en miocardio y a una reducción del contenido de glutatión en músculo e hígado, induciendo daño celular (Kondoh et al., 2003). Sin embargo, se ha sugerido que el ayuno intermitente favorece el control del estado redox celular (Anson et al., 2003; Bauer et al., 2004).

En este estudio analizamos el efecto de la deficiencia de PASK en hígado, en respuesta a un estado de ayuno prolongado. De este modo, los ratones fueron ayunados durante 48 horas, situación donde las reservas energéticas son mínimas (Von Oettinger and Trujillo, 2015). Nuestros datos indican que los niveles de ATP en hígado descienden, como consecuencia del ayuno, y, además, la generación endógena de ROS.

Estudios previos de Hao y cols. señalaron que los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> presentaban, en condiciones de ayuno, un alto contenido de ATP en músculo esquelético, a pesar de que la ingesta de alimentos no variaba, manifestando un fenotipo hipermetabólico (Hao et al., 2007). Igualmente, nuestros datos indican que la deficiencia de PASK mantiene elevado el contenido de ATP en hígado, siendo similar a los niveles que presentan los ratones silvestres en estado basal, es decir, el metabolismo energético permanece activo, independientemente de la disponibilidad de nutrientes (**Figura 51**). Estos resultados también están en correlación con estudios previos en mioblastos y células de neuroblastoma de ratón (N2A) silenciadas en PASK (Hao et al., 2007; Hurtado-Carneiro et al., 2013a).

Nuestros resultados en hígado fueron apoyados por estudios *in vitro* realizados en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) deficientes en PASK, pues esta línea celular nos permitía disponer de un sistema *in vitro* donde observar la sensibilidad y la respuesta de las células carentes en PASK, frente a estímulos estresantes.

Nuestros resultados *in vitro* se basan en el análisis del contenido de ATP y ROS en MEFs tratados durante 2 horas, a distintas concentraciones de glucosa, considerándose baja glucosa 2,5 mM y alta glucosa 20 mM. La concentración de glucosa estándar del medio de cultivo fue de 25 mM. Estudios de otros grupos han señalado que los MEFs son capaces de subsistir en un medio de cultivo a una concentración de 4 mM de glucosa, e incluso en un medio sin glucosa durante al menos 12 horas sin llegar a presentar ningún tipo de alteración celular (Wu and Derynck, 2009).

Los datos obtenidos en nuestro trabajo indican que los MEFs deficientes en PASK exhiben alto contenido de ATP y ROS, y alterada la expresión génica de las enzimas antioxidantes SOD-Mn y SOD-Cu/Zn.

Los resultados obtenidos *in vitro* no han sido extrapolables a los alcanzados *in vivo*, pues hay que tener en cuenta que, en los experimentos realizados en líneas celulares se analizan los efectos directos de la glucosa de forma independiente. En cambio, en situaciones como el ayuno y la alimentación, el efecto examinado puede ser una acción combinada hormonal de todo el metabolismo y actividad oxidativa involucrada en el mantenimiento del estado redox celular.

Además, estudiamos la respuesta celular frente a una situación de estrés. Para ello, los MEFs fueron tratados con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 2 horas, pues se ha descrito que los MEFs expuestos a concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  superiores a 150  $\mu\text{M}$  se encuentran en un estado proapoptótico (Guo et al., 2010). Interesantemente, nuestros datos muestran que, aunque los MEFs deficientes en PASK poseían elevados niveles de ROS en estado normal, la inducción de estrés en ellos producía un dramático descenso de ROS. Por tanto, nuestros datos confirman que los MEFs deficientes en PASK están mejor protegidos frente a una situación de estrés. Esto se contradecía con lo descrito previamente en levaduras carentes en PASK tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Huang et al., 2014).

La adaptación a condiciones ambientales desfavorables como el ayuno prolongado sin duda requiere la activación de procesos que estén controlados a nivel transcripcional por los factores respiratorios nucleares (NRFs) o los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs). La actividad de estos factores de transcripción está modulada por coactivadores transcripcionales, que controlan la expresión de los diferentes componentes necesarios para regular la producción de ATP. Uno de estos coactivadores es PGC-1 $\alpha$ , conocido por ser el principal regulador del metabolismo oxidativo y de la biogénesis mitocondrial, promoviendo la adaptación a condiciones que requieren energía, incrementando la masa mitocondrial (Jornayvaz and Shulman, 2010).

Estudios previos han señalado que la expresión génica de *Pgc-1α* y *Ppar-α* no varía en los ratones deficientes en PASK alimentados con una dieta rica en grasa (HFD) (Hao et al., 2007).

Nuestros datos señalan que los ratones *Pask<sup>-/-</sup>*, en estado de ayuno prolongado, mantienen activa la generación hepática de ATP y ROS. Además, presentan elevada la expresión hepática de *Pgc-1α*, *Nrf2*, *Ppar-α* y *Ppar-γ*, implicados en la biogénesis y la función mitocondrial (**Figura 51**). Asimismo, la deficiencia de PASK aumenta el contenido de ADNmt, un indicador primordial de la biogénesis mitocondrial, e igualmente la expresión del gen *Cox-IV*, un componente de la cadena de transporte electrónico, sin embargo, no hemos observado diferencias significativas en la expresión génica de *Cs*, utilizada como marcador de la capacidad oxidativa (Corona and Duchon, 2016; Vigelso et al., 2014).

De este modo, nuestros resultados sugieren que la biogénesis mitocondrial podría estar estimulada en los ratones deficientes en PASK, y ello estaría en consonancia con la protección que muestran estos ratones a desarrollar obesidad, inducida con dietas ricas en grasa, como ya había sido descrito (Hao et al., 2007; Pérez-García et al., en prensa; Wu et al., 2014).

Por otra parte, la biogénesis mitocondrial, la fisión, la fusión y la mitofagia son procesos biológicos interconectados entre sí, siendo esenciales para el control de la calidad mitocondrial (Gottlieb and Gustafsson, 2011). Así, el mantenimiento de mitocondrias viables es primordial para la función celular, especialmente en hígado, un órgano con una elevada demanda energética. De este modo, la calidad de la función mitocondrial está basada en la producción de mitocondrias sanas (biogénesis mitocondrial), la eliminación de mitocondrias no funcionales (mitofagia) y la generación de fisiones mitocondriales; asegurando el mantenimiento de los intermediarios implicados en el metabolismo

(glicólisis, ciclo de los ácidos tricarboxílicos, fosforilación oxidativa). Pero, como consecuencia de la actividad metabólica, se producen las especies reactivas de oxígeno, que se conservan a niveles equilibrados mediante las defensas antioxidantes (Palikaras et al., 2015), manteniendo la homeostasis redox celular.

En nuestro estudio se hicieron micrografías de hepatocitos para la visualización de las mitocondrias. Es destacable que la deficiencia de PASK aumenta la presencia de: vacuolas autofágicas, múltiples asociaciones mitocondria-retículo endoplasmático rugoso (RER); una señal indicativa de la existencia de fisiones mitocondriales y numerosas mitofagias; éstas primordiales en la supervivencia celular. Aunque estos hallazgos morfológicos sugieren una relación entre la proteína PASK, la integridad y el mantenimiento de la calidad mitocondrial, se necesitan estudios adicionales para obtener datos más concluyentes.

Por tanto, ante tales resultados evidenciamos que PASK controla el estado redox en hígado, pues su deficiencia regula la biogénesis y la función mitocondrial, y potencia la expresión de enzimas antioxidantes; y probablemente participa en la regulación de la mitofagia como un posible mecanismo protector frente a situaciones que induzcan estrés oxidativo.

## **2. IMPLICACIÓN DE LA PASK EN SUPERVIVENCIA Y PROTECCIÓN FRENTE AL ESTRÉS CELULAR**

Del mismo modo que la proteína PASK, las proteínas desacetilasas dependientes de NAD<sup>+</sup>, las sirtuinas, actúan como sensores metabólicos del estado redox celular. Así, la sirtuina más estudiada ha sido la SIRT-1, pues regula una gran variedad de respuestas

celulares como la supervivencia celular, la apoptosis y la biogénesis mitocondrial (Suliman and Piantadosi, 2014).

Nuestros resultados, junto con otros estudios previos (Gerhart-Hines et al., 2007; Rodgers et al., 2005), indican que la SIRT-1 hepática es inducida en condiciones que requieren energía como el ayuno (24 y 48 horas, en nuestro caso), y que junto a la proteína AMPK (Hurtado-Carneiro et al., 2014), regulan la activación transcripcional de PGC-1 $\alpha$ , modulando las propiedades y la función mitocondrial (Austin and St-Pierre, 2012).

Estudios previos del grupo describieron que la deficiencia de PASK alteraba la respuesta de activación de AMPK, ante situaciones de ayuno/alimentación, pues AMPK permanecía sobreactivada, en respuesta a la alimentación cuando debería estar inhibida en esta condición (Hurtado-Carneiro et al., 2014). Además, en el presente trabajo observamos que la deficiencia de PASK aumenta la expresión hepática de *Sirt-1* y *Pgc-1 $\alpha$* , aunque este efecto no ha sido observado a nivel de proteína.

Se ha descrito que la localización subcelular de SIRT-1 varía dependiendo del tejido y del estado energético celular. Precisamente, en algunos subtipos de neuronas de ratón, la SIRT-1 se expresa predominantemente en el citoplasma, en cambio en los espermatoцитos principalmente se localiza en el núcleo (Tanno et al., 2007). Asimismo, la localización subcelular de SIRT-1 varía durante el desarrollo embrionario, respondiendo a distintos estímulos fisiológicos (Rosenberg and Parkhurst, 2002). Por tanto, su ubicación influye directamente en su funcionalidad.

Nuestros datos revelan que los ratones deficientes en PASK muestran alterada la localización subcelular de SIRT-1, ubicándose mayoritariamente en el núcleo de los hepatocitos, mientras que su situación es citosólica en el caso de los ratones silvestres. Previamente, el aumento de la actividad nuclear de SIRT-1 se ha correlacionado

positivamente con la sobreexpresión de genes coactivados por PGC-1 $\alpha$  (*Nrf2*, *Ppar- $\alpha$* , *Ppar- $\gamma$* ), a pesar de que los niveles de la proteína no variasen (Gurd et al., 2011). Asimismo, se ha descrito que PGC-1 $\alpha$  induce la expresión de enzimas antioxidantes como SOD y GPx (St-Pierre et al., 2006; St-Pierre et al., 2003).

Estudios previos describieron que niveles elevados de las proteínas AMPK y SIRT-1, en condiciones de ayuno, promueven la translocación nuclear y la actividad transcripcional de FoxO3a. Éste activa genes de reparación del ADN y enzimas antioxidantes (SOD-Mn y CAT), como mecanismo de protección y supervivencia celular al estrés oxidativo y metabólico (Brunet et al., 2004; Klotz et al., 2015).

Nuestros datos señalan que el ayuno (24 y 48 horas) eleva la expresión hepática de *Sirt-1* y aumenta la activación de la AMPK (Hurtado-Carneiro et al., 2014), ambas desacetilan y fosforilan, respectivamente, a FoxO3a, favoreciendo su translocación nuclear y su actividad transcripcional. Es importante destacar que la deficiencia de PASK sobreexpresa el gen *FoxO3a* en hígado, independientemente del estado nutricional.

Por tanto, nuestros resultados demuestran que la deficiencia de PASK promueve las condiciones necesarias para incrementar la expresión nuclear de SIRT-1 y la activación de la AMPK (Hurtado-Carneiro et al., 2014), sugiriendo que, posiblemente se induzca la translocación nuclear y la actividad transcripcional de FoxO3a, que se confirma con la sobreexpresión de los genes antioxidantes *Sod-Mn* y *Cat*.

Además, la SIRT-1 puede modular la actividad transcripcional de la proteína supresora de tumores p53, el principal regulador de la apoptosis y de la supervivencia celular (Yi and Luo, 2010). La estabilidad y la actividad de p53 están finamente reguladas por numerosos estímulos dañinos que pueden inducir roturas en la doble hebra de ADN

como la radiación ultravioleta (UV), pues su vida media, en ausencia de daño celular, es corta (Lavin and Gueven, 2006).

Nuestros resultados han indicado que el ayuno prolongado (24 y 48 horas), en el caso de los ratones silvestres, eleva notablemente la expresión hepática de *p53*, sin embargo, los niveles de la proteína son apenas detectables. Se ha visto que *p53* en el ayuno, puede ser regulado, a nivel post-transcripcional por la desacetilasa SIRT-1, inhibiendo su actividad, para fomentar la supervivencia celular (Yi and Luo, 2010).

*p53* se localiza mayoritariamente en el núcleo, activando o reprimiendo genes proapoptóticos, pero puede translocarse a la mitocondria, donde directamente se localiza en la matriz mitocondrial, activando e inhibiendo diversas proteínas como la enzima antioxidante SOD-Mn, regulando la función mitocondrial y el estado redox celular (Liu and Xu, 2011; Wang et al., 2014).

Así, la deficiencia de PASK disminuye considerablemente los niveles de la proteína SOD-Mn. Estos resultados se contradicen con los obtenidos en su expresión génica, pudiendo indicar que quizás la enzima SOD-Mn sea alterada por la presencia de la proteína *p53* mitocondrial, pues se ha revelado que puede interaccionar con dicha enzima, alterando su respuesta antioxidante y activando mecanismos proapoptóticos (Robbins and Zhao, 2012).

Estudios previos han indicado que los ratones deficientes en *p53* (*p53*<sup>-/-</sup>) exhiben menor expresión génica de *Pgc-1α* y bajo contenido mitocondrial en músculo esquelético, ya que *p53* está también involucrado en la regulación de la biogénesis mitocondrial (Park et al., 2009; Saleem et al., 2009).

Nuestros datos señalan que, en situación de ayuno, los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> muestran mayores niveles de la proteína *p53* en hígado, como un posible mecanismo de regulación



del estado redox celular, controlando probablemente la biogénesis y la función mitocondrial. Estos resultados no han sido concordantes con su expresión génica, pues los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> presentan menor expresión de *p53*, respecto a los controles ayunados.

Se ha visto que bajos niveles de expresión de p53 son determinantes para la transcripción de enzimas detoxificantes modulada por el factor de transcripción NRF2 (Chen et al., 2012; Fan et al., 2014). De este modo, hemos visto que la deficiencia de PASK estimula la transcripción de genes antioxidantes inducidos por NRF2. Por tanto, PASK y la regulación de NRF2 por p53 podrían ser claves para la coordinación de los mecanismos de supervivencia y muerte celular, aunque serían necesarios estudios adicionales para poder confirmar estas primeras evidencias.

NRF2 es uno de los principales reguladores del estado redox celular. En condiciones fisiológicas normales, NRF2 está localizado en el citoplasma, interaccionando con el factor KEAP1, que le dirige hacia la degradación proteosomal (Oh and Jun, 2017; Wasik et al., 2017). Sin embargo, en respuesta al estrés oxidativo, NRF2 se disocia de KEAP1 y se transloca al núcleo, activando la transcripción de numerosos genes de enzimas detoxificantes como la glutamato cisteína ligasa (GCL), la hemoxigenasa-1 (HO-1) o la SOD-Cu/Zn (Wasik et al., 2017).

Estudios previos en hígado y fibroblastos embrionarios de ratón han indicado que la supresión de NRF2 altera la expresión de ambas subunidades de la enzima GCL (la catalítica, GCLc y la reguladora, GCLm), reduciéndose el contenido del glutatión celular, en respuesta a estrés oxidativo (Chan and Kwong, 2000; Leung et al., 2003). Asimismo, NRF2 regula la expresión de proteínas claves en la mitofagia, estimulando la protección y la supervivencia celular frente al estrés oxidativo (Murata et al., 2015).

Nuestros resultados señalan que la deficiencia de PASK en el ayuno (en nuestro caso, 24 y 48 horas) sobreexpresa los genes *Nrf2* y *Gclm*. Se ha descrito que la activación de NRF2 mejora la eficiencia de la fosforilación oxidativa y la producción de ATP, siendo un importante modulador de la función mitocondrial (Holmstrom et al., 2013; Swamy et al., 2016). Además, el ayuno prolongado podría acarrear la activación de NRF2, desencadenando una respuesta de adaptación a la inanición (Tao et al., 2017).

Sin embargo, observamos una discordancia entre la expresión génica y los niveles de la proteína NRF2, en el caso de los ratones silvestres ayunados. Esto podría deberse a su regulación post-traducciona, incluyendo posibles alteraciones en su asociación con el factor KEAP1, el principal responsable de que sea o no dirigido hacia la degradación proteosoma.

Asimismo, esta discordancia también la encontramos en la enzima GCLm. Por ello, analizamos la expresión del miR-433, pues estudios previos lo describieron como un modulador post-transcripcional del gen *Gclm* (Espinosa-Diez et al., 2015).

Nuestros resultados sugieren que la expresión hepática del miR-433 disminuye en el ayuno (48 horas), deduciendo que este miARN, en nuestro caso, no explica las diferencias que hay entre la expresión del gen *Gclm* y su proteína. Posiblemente, las discrepancias podrían ser debidas a la regulación específica de tejido y a diferencias experimentales, puesto que en nuestro caso analizamos la adaptación de la expresión hepática del miR-433, bajo distintos estados nutricionales (alimentación y ayuno).

Además, nos cuestionamos si PASK modulaba la expresión hepática del miR-433, ya que ambos están implicados en la regulación del estado redox (Espinosa-Diez et al., 2015; Wang, 2017). De este modo, nuestros datos confirman que PASK muestra un papel clave en

la regulación de la expresión génica, a nivel post-transcripcional por el miR-433, al menos, en respuesta a estados de ayuno/alimentación.

Por otra parte, la vía de señalización redox NRF2/KEAP1 puede ser regulada a nivel post-traducciona mediante fosforilación, desacetilación o sumolización, e incluso asociarse con otras proteínas, controlando su distribución intracelular, su actividad y su degradación (Zhang et al., 2015b). De este modo, la fosforilación de NRF2 es primordial para su activación, su translocación nuclear y, por consiguiente, para activar la transcripción de numerosos genes de enzimas antioxidantes. Precisamente, la ruta de señalización PI3K/Akt (Fosfatidilinositol 3-quinasa/Proteína quinasa B) facilita la inducción del sistema redox NRF2/KEAP1, teniendo un papel fundamental en la supervivencia celular (Wang et al., 2008).

Nuestros datos apuntan a que el ayuno prolongado (24 y 48 horas) disminuye considerablemente los niveles de fosfo-Akt (Ser473), sin embargo, es sorprendente observar que la deficiencia de PASK sobreactiva la proteína Akt, a pesar de las condiciones de depleción energética (**Figura 51**). Estudios previos relacionaron la activación de la Akt con la estimulación de las vías de supervivencia, previniendo la muerte celular (Cai et al., 2008).

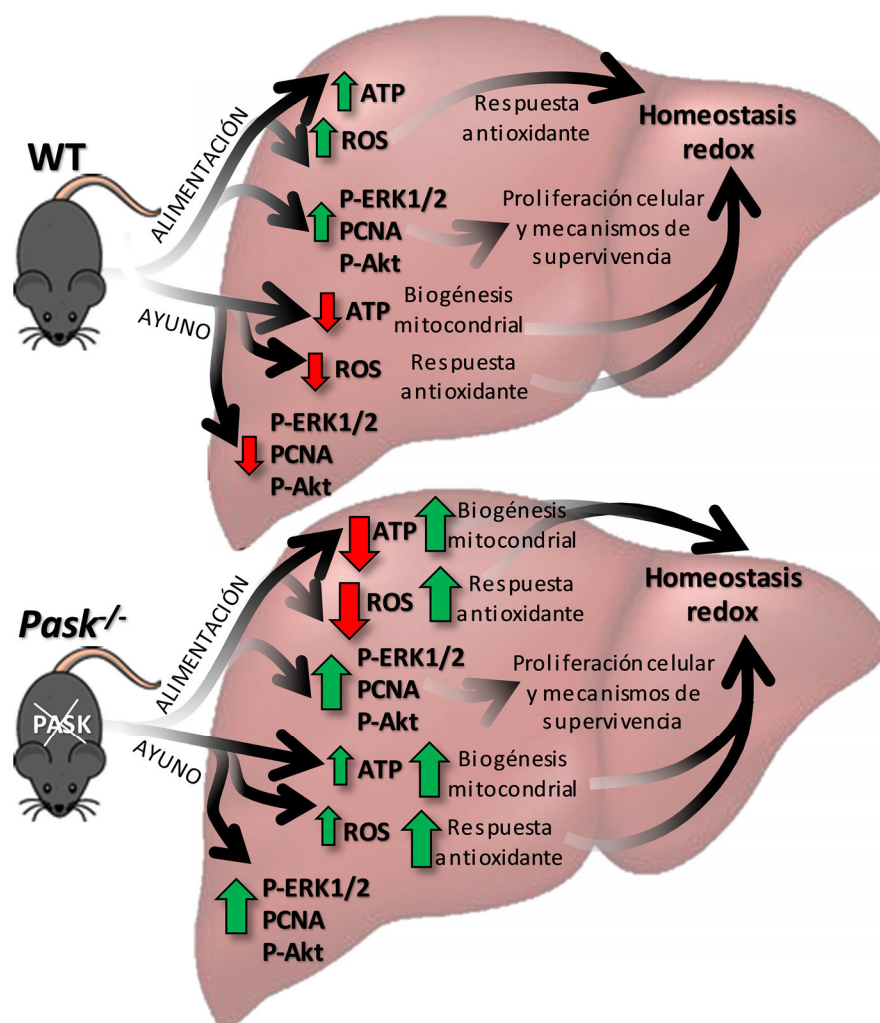
Sin embargo, todavía no hay estudios que confirmen que la proteína Akt sea la responsable directa de la fosforilación de NRF2, sino otras proteínas reguladas por Akt, como la glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) (Salazar et al., 2006). Además, se ha visto que la fosforilación de NRF2 por parte de las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares, tipo 1 y 2 (ERK1/2), dos miembros de la familia de las MAP quinasas (proteínas quinasas activadas por mitógenos), incrementan su estabilidad y actividad nuclear (Wang et al., 2015a).

Estudios previos en varias líneas celulares han afirmado, que tras un estímulo que ocasiona daños a nivel del ADN como las radiaciones UV, se activan las proteínas ERK1/2, aumentando la actividad transcripcional de p53 y promoviendo mecanismos proapoptóticos (Billecke et al., 2006; Hayakawa et al., 1999). Además, estudios con células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), han localizado a la proteína ERK2 en la matriz mitocondrial, controlando el proceso de la mitofagia para el mantenimiento de la homeostasis redox celular (Czabotar et al., 2014; Dagda et al., 2008). Por tanto, las proteínas quinasas ERK1/2 ejecutan diversas funciones, atendiendo al tipo celular, a la magnitud del estímulo inductor, a la localización subcelular y al grado de activación. Estas proteínas quinasas se activan en respuesta a mitógenos y a señales proliferativas, y además juegan un papel fundamental en el control del estado redox, en la proliferación, la supervivencia o la muerte celular (Dagda et al., 2008; Juhasz et al., 2017).

Nuestros resultados señalan que el ayuno prolongado (48 horas) suprime drásticamente los niveles de fosfo-ERK1/2 (Thr202/185) (estado activado de estas proteínas). Se ha visto que la inhibición de ERK1/2 induce un estado proapoptótico (Lu and Xu, 2006). Sin embargo, es sorprendente que la deficiencia de PASK mantiene elevados los niveles hepáticos de ERK1/2 activa, a pesar del déficit energético, quizás como un posible mecanismo de supervivencia celular (**Figura 51**). Estos resultados están de acuerdo con los niveles elevados de la proteína NRF2 y de su gen diana *Gclm*, controlando así el estado redox y promoviendo la supervivencia celular.

Además, hemos observado que la deficiencia de PASK eleva los niveles hepáticos de la proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), la cual participa en los mecanismos de replicación y reparación, tras un daño del ADN, fomentando la supervivencia celular (Kelman, 1997) (**Figura 51**).

Así, nuestros datos sugieren que la deficiencia de PASK a pesar de elevar los niveles de la proteína p53 que podrían estar relacionados con la inducción de apoptosis, al mismo tiempo activa las proteínas ERK1/2 y PCNA, evidenciando una mayor capacidad proliferativa en hígado, sin embargo, no podemos descartar que estos efectos podrían estar respondiendo a posibles daños celulares.



**Figura 51.** Esquema resumen de los efectos que ejercen el estado nutricional (alimentación y ayuno) y la deficiencia de PASK en la regulación del estado redox hepático.

### **3. PARTICIPACIÓN DE LA PASK EN LA ACCIÓN REGULADORA DE LA EXENDINA-4 EN EL METABOLISMO OXIDATIVO**

La exendina-4 es un análogo sintético estructuralmente parecido al péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), pero más estable que éste *in vivo*. Además, es una hormona insulínica, pues estimula la secreción postprandial de insulina, y anorexigénica, ya que induce la saciedad e inhibe la ingesta de alimentos. Por ello, es muy utilizada en la clínica como agente antidiabético.

Estudios previos realizados en células  $\beta$  pancreáticas de ratón en cultivo, señalan que PASK actúa como un sensor de nutrientes, siendo mayor su expresión a elevados niveles de glucosa (da Silva Xavier et al., 2011). En cambio, investigaciones previas del grupo han señalado que en el SNC, la expresión del gen *Pask* se incrementa a bajas concentraciones de glucosa en regiones hipotalámicas y en las células de neuroblastoma de ratón (Hurtado-Carneiro et al., 2014), pero este efecto es revertido en presencia de GLP-1. Además, la expresión génica de *Pask* es controlada por los estados nutricionales de alimentación/ayuno en las áreas hipotalámicas implicadas en la regulación de la ingesta de alimentos (Hurtado-Carneiro et al., 2014).

Los datos obtenidos en este trabajo corroboran lo ya descrito previamente (Wu et al., 2014), que la expresión del gen *Pask* en hígado, es regulada por los estados nutricionales (alimentación y ayuno), disminuyendo considerablemente en situación de ayuno prolongado (48 horas). Además, hemos visto que la exendina-4 impide la expresión génica de *Pask*, sugiriendo que algunos efectos de la exendina-4 en hígado, podrían ser mediados por el bloqueo de PASK. Y probablemente, la acción reguladora de la exendina-4 en la expresión del gen *Pask* podría ser específica de tejido, al igual que la adaptación a cambios nutricionales de PASK.

GLP-1 produce un descenso rápido de la glucosa en sangre, a causa de su acción incretina, pues libera insulina tras la ingesta de alimentos, por tanto, su actividad es dependiente de glucosa, y además estimula la saciedad e inhibe la ingesta de alimentos, debido a su acción anorexigénica. Estudios previos del grupo describieron que los ratones *Pask<sup>-/-</sup>* presentaban menor respuesta a la acción anorexigénica del GLP-1 (Hurtado-Carneiro et al., 2014).

En nuestro estudio, hemos observado que los ratones *Pask<sup>-/-</sup>*, en estado basal, presentan menores niveles endógenos de GLP-1, respecto a los silvestres, sin embargo, en el ayuno esta situación es revertida. A pesar de eso, los resultados del test de tolerancia a la glucosa, realizado previamente por el grupo (Pérez-García et al., en prensa) y estudios anteriores de Hao y cols. (Hao et al., 2007), confirman que los niveles circulantes de glucosa e insulina en ausencia de exendina-4 no se encuentran alterados en los ratones deficientes en PASK, respecto a los controles.

Por otro lado, se ha visto que las acciones insulínótropicas de GLP-1 podrían moderar la actividad mitocondrial, a través de la regulación de la fosforilación oxidativa o la  $\beta$ -oxidación. Además, GLP-1 (o su análogo exendina-4, en nuestro caso) está implicado en la regulación del estado redox celular, pues controla, tanto la producción de radicales libres como la expresión de las enzimas antioxidantes (Tomas and Habener, 2010).

Estudios de Park y cols. realizados en ratones, indicaron que la administración subcutánea de exendina-4 a largo plazo (8 semanas), regulaba la concentración de glucosa en sangre, reducía la ganancia de peso, controlaba los niveles de especies reactivas de oxígeno en hígado y estimulaba la respuesta antioxidante (Park et al., 2007).

De tal modo, nuestro objetivo era analizar la acción reguladora en el metabolismo oxidativo de la exendina-4 a corto plazo (3 horas) y a una concentración de 250 ng/100 g

peso, inyectada subcutáneamente al ratón. Esta concentración fue 10 veces mayor que la empleada en otros estudios (Park et al., 2007), pero es la misma utilizada en investigaciones previas del grupo realizadas en hipotálamo e hígado de ratón, donde observaron que la exendina-4, a dicha concentración, no inducía ningún signo aparente de citotoxicidad (Hurtado-Carneiro et al., 2014). Incluso, ciertos estudios han señalado que la exendina-4, a una concentración de 10 veces mayor que la utilizada en nuestro estudio, exhibía efectos antiapoptóticos, estimulando la supervivencia celular (Gu et al., 2016). En el caso de los humanos, la exenatida es empleada a una dosis de 20 µg/kg para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Colerangle, 2008).

Nuestros resultados confirman lo ya descrito por otros autores (Athauda and Foltynie, 2016): la exendina-4 reduce la producción hepática de especies reactivas de oxígeno, siendo este efecto dependiente de glucosa. Los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> presentan mayor respuesta a la acción reguladora de la exendina-4 sobre la generación de ROS, bajo condiciones de carencia energética, pues hemos visto que, en estas condiciones estos ratones mantienen activo su metabolismo. Además, la exendina-4 estimula considerablemente la expresión hepática de las enzimas antioxidantes (SOD-Mn, SOD-Cu/Zn, GPx y CAT). Asimismo, regula la expresión de la enzima catalasa, localizada en el peroxisoma, siendo su efecto mayor en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup>, respecto a los controles. Se ha visto que ratones deficientes en catalasa (*Cat*<sup>-/-</sup>) presentan mayor probabilidad de desarrollar diabetes tipo 2 y obesidad (Heit et al., 2017). Nuestros resultados sugieren que la respuesta antioxidante de la exendina-4, en hígado, podría estar mediada al menos en parte por PASK.

Investigaciones previas realizadas en células de insulinoma de rata (INS-1) han señalado, que la exendina-4 incrementa la biogénesis, el número y la masa mitocondrial,



mejora la respiración mitocondrial e inhibe la actividad de proteínas proapoptóticas; ofreciendo una mayor protección celular (Kang et al., 2015). Esto se asoció a un aumento del coactivador PGC-1 $\alpha$ , pues modula la expresión de los genes *Nrf2* y *Ppar- $\gamma$* , implicados en la biogénesis y la función mitocondrial, ya que controlan la expresión génica de *Cox-IV* (Athauda and Foltynie, 2016; Dominy and Puigserver, 2013). Además, NRF2 es uno de los más importantes reguladores de la defensa celular, pues como ya indicamos, activa la transcripción de enzimas redox como la GCL (tanto la subunidad catalítica, GCLc, como la reguladora, GCLm), implicada en la biosíntesis del glutatión intracelular (Fainstein, 2007).

Nuestros datos indican que, 3 horas de la administración subcutánea de exendina-4 no es suficiente para elevar ni la expresión génica ni los niveles de la proteína NRF2 en hígado, pero sí la expresión del gen *Ppar- $\gamma$* , en estado de ayuno. Además, corroboramos lo ya descrito anteriormente, la exendina-4 induce la expresión génica y los niveles proteicos de COX-IV, mejorando la función y la respiración mitocondrial (Chae et al., 2015). La deficiencia de PASK en hígado modula el efecto de la exendina-4, tendiendo a aumentar la expresión génica de *Ppar- $\gamma$*  y los niveles proteicos de COX-IV y NRF2, independientemente del estado nutricional. Sin embargo, la administración subcutánea de exendina-4 (3 horas, en nuestro caso) reduce considerablemente la expresión génica de *Gclm*, implicada en la biosíntesis del glutatión intracelular, esto podría parecer contradictorio a lo ya descrito, aunque en estudios previos los tratamientos empleados fueron más prolongados en el tiempo (Li et al., 2015; Petersen et al., 2016).

Se ha sugerido que la activación de NRF2 a través del GLP-1 favorece la respuesta antioxidante y la captación de glucosa en el músculo esquelético, siendo beneficioso para la prevención y el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Oh and Jun, 2017).

Como se ha explicado anteriormente, los factores de transcripción NRF2 y PPAR- $\gamma$  son modulados por el coactivador PGC-1 $\alpha$ , regulando las propiedades y la función mitocondrial.

Se ha visto que la activación de GLP-1R podría influir en la regulación génica de *Pgc-1 $\alpha$* , ya que estudios previos realizados en células  $\beta$  pancreáticas han observado que la administración de exendina-4 incrementaba la expresión génica de *Pgc-1 $\alpha$*  en estas células (Kang et al., 2015). Por tanto, es evidente la interrelación que existe entre la activación de GLP-1R y la función mitocondrial.

En nuestro caso, los resultados señalan que la administración subcutánea de exendina-4 durante 3 horas no exhibe ninguna acción reguladora sobre la expresión génica de *Pgc-1 $\alpha$* , en condiciones normales. En cambio, en estado de ayuno aumenta considerablemente la expresión hepática de *Pgc-1 $\alpha$* , en respuesta a la exendina-4, coincidiendo precisamente con su pico de actividad en situaciones que requieren energía como el ayuno (Canto and Auwerx, 2009). Además, la deficiencia de PASK favorece la acción de la exendina-4 sobre la función mitocondrial, elevando la expresión hepática del gen *Pgc-1 $\alpha$* , independientemente del estado nutricional. Sin embargo, hemos observado una discordancia entre la expresión génica y los niveles de la proteína PGC-1 $\alpha$ , pues su actividad puede ser regulada también a nivel post-transcripcional, por fosforilación y desacetilación, mediante la proteína AMPK y la enzima SIRT-1, respectivamente (Athauda and Foltynie, 2016).

Estudios previos del grupo describieron que la activación de AMPK en condiciones de ayuno, es bloqueada por la administración subcutánea de exendina-4 (en este caso, 1 hora), sin embargo, la deficiencia de PASK alteraba la respuesta de la AMPK, en respuesta al estado nutricional y al tratamiento con exendina-4 (Hurtado-Carneiro et al., 2014).

Investigaciones previas de Athauda y Foltynie indicaron que la administración subcutánea de exendina-4 a largo plazo (1 semana) aumentaba la expresión hepática de *Sirt-1* (Athauda and Foltynie, 2016). Sin embargo, nuestros datos señalan que a tiempos cortos (en nuestro caso, 3 horas), la exendina-4 no exhibe una acción estimuladora sobre la expresión génica de *Sirt-1*.

También, se analizó el efecto de la exendina-4 sobre el miR-433, que según la base de datos targets.org podría regular al gen *Pgc-1 $\alpha$* . Nuestros resultados indican que la expresión del miR-433 disminuye en el ayuno, pero la exendina-4 revierte este efecto en los ratones silvestres. La deficiencia de PASK favorece la expresión del miR-433, en respuesta a la exendina-4, bajo situación basal, deduciéndose que este miARN, en nuestro caso, podría regular la expresión a nivel post-transcripcional de PGC-1 $\alpha$ . Por tanto, el miR-433 podría ser uno de los posibles responsables de moderar a PGC-1 $\alpha$ , bajo distintos estados nutricionales (alimentación y ayuno).

Por otra parte, se ha descrito que la activación de GLP-1R promueve la proliferación celular, regula los mecanismos de reparación del ADN frente a estímulos dañinos e inhibe el proceso de la apoptosis, fomentando la supervivencia celular (Aviv et al., 2009; Gu et al., 2016; Zhang et al., 2017). Sin embargo, nuestros datos indican que la administración subcutánea de exendina-4 a corto plazo (3 horas), reduce en mayor o menor medida los niveles basales proteicos de PCNA, implicada en proliferación celular. No obstante, la deficiencia de PASK revierte dicho efecto y, además tiende a promover la proteína p53, tanto en estado basal como en ayuno. Así, deducimos que los efectos de la exendina-4 en el control de los mecanismos hepáticos implicados en la apoptosis, reparación y proliferación celular, en respuesta a estímulos nocivos, pueden estar mediados por la PASK, cuya deficiencia tiende a favorecerlos.

Además, estudios previos han relacionado, a su vez, la viabilidad celular y la capacidad proliferativa con los niveles de expresión del miR-433 (Wang, 2017). De este modo, especulamos que la respuesta de la exendina-4, en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> sobre la elevada capacidad proliferativa celular es concordante con el aumento de la expresión del miR-433.

Todos estos resultados, en conjunto, apuntan a que el tratamiento de 3 horas con exendina-4 no es suficiente para observar una respuesta a nivel de la biogénesis y la función mitocondrial. Pues quizás, el tiempo de tratamiento sea determinante, ya que otros estudios han señalado que el tratamiento con exendina-4 debe ser prolongado para que su acción sea a nivel mitocondrial (Goralska et al., 2017). Sin embargo, la deficiencia de PASK favorece la acción de la exendina-4, pues estimula la expresión de varios genes hepáticos involucrados en la biogénesis mitocondrial. Así, evidenciamos que algunos efectos de la exendina-4, en relación con la biogénesis y la función mitocondrial en hígado, podrían ser modulados por PASK.

#### **4. FUNCIÓN DEL SENSOR METABÓLICO PASK EN EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO**

El envejecimiento es un proceso multifactorial caracterizado por la generación de estrés oxidativo, la alteración de la función mitocondrial, la desregulación de la autofagia y el acortamiento de los telómeros; ocasionando gradualmente la aminoración de las funciones fisiológicas (de Almeida et al., 2017).

De este modo, el objetivo que nos planteamos fue analizar la implicación de la PASK en el proceso de envejecimiento. De este modo, los ratones empleados en nuestro estudio

pertenecen a la cepa C57BL/6J, pues se caracterizan por tener una vida media corta y por su relativa proximidad en su genoma y fisiología con los humanos.

En primer lugar, estudiamos la expresión hepática del gen *Pask* durante el envejecimiento. Para ello, empleamos ratones jóvenes (3-5 meses), de mediana edad (12 meses) y viejos (18-20 meses). De este modo, hemos observado que la expresión génica de *Pask* disminuye con la edad, llegando a no ser detectada en los ratones de 18-20 meses de edad.

El envejecimiento está asociado al desarrollo de diversas enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2, ya que la tolerancia a la glucosa disminuye progresivamente con la edad, como consecuencia de la resistencia a la acción de la insulina. Esto es causado por diversos factores relacionados con la edad como el aumento de la adiposidad, la disminución de la sensibilidad a la insulina y la disfuncionalidad de las células  $\beta$  pancreáticas (de Almeida et al., 2017).

Así, nuestros resultados confirman lo ya descrito por otros autores (Houtkooper et al., 2011), los ratones C57BL/6J envejecidos (en nuestro caso 18-20 meses) muestran elevados niveles de glucosa, observándose una menor tolerancia a la glucosa y reducida sensibilidad a la insulina. Asimismo, la concentración de insulina en sangre se eleva  $\sim 4$  veces y el índice HOMA-IR supera los valores normales ( $>2,9$ ), siendo evidente la aparición de la resistencia a la acción de la insulina en edades avanzadas.

Los datos obtenidos en nuestro trabajo de investigación, junto con estudios previos del grupo (Pérez-García et al., en prensa) y análisis anteriores de Hao y cols. (Hao et al., 2007), confirman que los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> de 3-5 meses de edad no muestran alterada la tolerancia a la glucosa y a la insulina, respecto a los silvestres. En cambio, hemos observado importantes diferencias en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> de 18-20 meses de edad, respecto a los

controles. Pues, en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> envejecidos no están alterados los niveles circulantes de glucosa y la concentración de insulina en sangre aumenta en menor proporción, con respecto a los ratones silvestres. Asimismo, muestran mejor tolerancia a la glucosa, y un aumento de la sensibilidad a la insulina y, además, el índice HOMA-IR está dentro de los parámetros normales (0,5-2,0). Por tanto, es evidente que los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> no llegan a desarrollar resistencia a la insulina a esta edad (**Figura 52**).

Uno de los principales contribuyentes al desarrollo de la resistencia a la acción de la insulina es el aumento del peso corporal. De este modo, nuestras investigaciones se centraron en analizar el peso corporal de ratones machos C57BL/6J silvestres o deficientes en PASK, de distintas edades comprendidas entre los 3 y 24 meses.

A lo largo de la vida, los ratones muestran distintas fases, en cuanto a la ganancia de peso. El peso corporal aumenta durante el primer año de vida, mientras que, a partir de los 15 meses de edad disminuye paulatinamente. Pero, estas fases varían dependiendo de la cepa y del sexo del ratón (Mitchell et al., 2016). Nuestros resultados señalan que los ratones silvestres machos C57BL/6J muestran un aumento del peso corporal, a partir de los 6 meses de edad hasta los 20 (edad máxima estudiada en este caso), de acuerdo con lo ya descrito (Mitchell et al., 2016). En cambio, los ratones *Pask*<sup>-/-</sup>, a partir de los 15 meses de edad hasta los 24, tienden a reducir paulatinamente su peso corporal, lo que podría ayudar a impedir el desarrollo de resistencia a la insulina en edades avanzadas. Estudios previos ya habían descrito que los ratones deficientes en PASK estaban protegidos contra el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina, inducidas por dietas ricas en grasa (Hao et al., 2007; Hao and Rutter, 2008; Pérez-García et al., en prensa; Wu et al., 2014), sin embargo, se desconocía esto en el caso del proceso de envejecimiento.

Es curioso que estos ratones (tanto silvestres, como *Pask<sup>-/-</sup>*) disminuyan de peso corporal entre los 3 y 6 meses de edad. La reducción del peso corporal que muestran los ratones jóvenes se ha asociado a una mayor actividad física en edades tempranas (Mitchell et al., 2016).

Además, estudiamos algunos marcadores bioquímicos relacionados con el metabolismo lipídico, que se encuentran altamente alterados en el proceso de envejecimiento como el colesterol total, el colesterol HDL (c-HDL), el colesterol LDL (c-HDL) y los triglicéridos.

Estudios de Houtkooper y cols. realizados en ratones C57BL/6 de 22 meses de edad señalaron que exhibían elevados niveles séricos de ácidos grasos libres, pero bajos los niveles de triglicéridos (Houtkooper et al., 2011). En cambio, nuestros datos del perfil lipídico en ratones de 18-20 meses de edad, revelan que no hay diferencias considerables, con respecto a los ratones de 3-5 meses de edad. Sin embargo, es sorprendente que las concentraciones plasmáticas de colesterol total, triglicéridos y c-HDL descendan considerablemente en los ratones *Pask<sup>-/-</sup>* envejecidos, siendo asimismo éstos inferiores a los de los ratones silvestres. Estos resultados podrían estar directamente correlacionados con la tendencia que tienen los ratones *Pask<sup>-/-</sup>* envejecidos a disminuir de peso corporal, pues se ha visto que el descenso del peso corporal favorece la bajada de los niveles de colesterol total, c-HDL y triglicéridos (Uranga and Keller, 2010).

El hígado experimenta cambios moleculares durante el proceso de envejecimiento como es la generación de estrés oxidativo que implica la producción de daños celulares, ocasionando el deterioro progresivo de la función mitocondrial y por tanto, alterando el mantenimiento de la homeostasis redox celular (Cabistol, 2014).

Nuestros datos señalan lo ya corroborado por otros autores (Cui et al., 2012): los ratones viejos (18-20 meses) exhiben mayores niveles basales de especies reactivas de oxígeno, con respecto a los jóvenes (3-5 meses). Asimismo, los sistemas de protección antioxidante disminuyen drásticamente, fomentándose un estado de estrés oxidativo celular, característico de la vejez (Helmy, 2012; Ji et al., 1990; Sudheesh et al., 2010). Sin embargo, la deficiencia de PASK mantiene baja la producción hepática de ROS, disminuyendo menos la expresión génica de las enzimas antioxidantes (SOD-Mn, SOD-Cu/Zn, CAT y GPx), en algunas condiciones (**Figura 52**).

La señalización redox desempeña un papel fundamental en la respuesta adaptativa frente a estímulos oxidativos. De este modo, el sistema de señalización NRF2/KEAP1 es una de las vías de supervivencia y defensa celular más destacables contra el estrés oxidativo, pues regula la transcripción de enzimas redox como la GCL o la HO-1. Sin embargo, la eficiencia de este sistema redox disminuye con la edad, alterándose significativamente la respuesta antioxidante (Zhang et al., 2015b). Uno de los posibles motivos que explican la alteración de la señalización redox en el proceso de envejecimiento es que la actividad de NRF2 es suprimida por diversos reguladores como el protooncogén c-Myc, ya que éste permanece elevado durante la vejez (Levy and Forman, 2010; Zhou et al., 2017).

Estudios previos revelaron que los niveles proteicos de NRF2 y la expresión génica de *Gclc* y *Gclm*, disminuían en hígado y pulmón de ratas de 24 meses (Liu and Choi, 2000; Shih and Yen, 2007). Sin embargo, otros autores vieron que la expresión génica de *Nrf2* aumentaba en cerebelo de ratones de 21 meses (Zhang et al., 2012). Estudios posteriores concluyeron que la expresión de los genes *Gclc* y *Gclm* podría diferir, en cuanto a la edad (Yuan et al., 2014). Igualmente, algunos estudios en pulmón, cerebro e hipocampo de ratones envejecidos han confirmado que se incrementaba la expresión basal de la *Ho-1*



(Zhang et al., 2015b), contradiciéndose con lo descrito previamente (Kaliman and Nikitchenko, 1989).

Por tanto, la discordancia que hay entre los distintos estudios sugiere que los niveles basales de NRF2, GCLc, GCLm y HO-1 varían con la especie, el tejido y el tipo celular estudiado, y además podrían o no variar linealmente con la edad (Zhang et al., 2015b).

En nuestro estudio, los niveles de la proteína NRF2 y la expresión hepática de los genes *Gclc*, *Gclm* y *Ho-1* disminuyen considerablemente en los ratones envejecidos (18-20 meses), respecto a los jóvenes (3-5 meses). Esto podría evidenciar que los ratones C57BL/6J viejos son más susceptibles de generar estrés oxidativo hepático, pues la respuesta antioxidante de NRF2 se encuentra alterada (Toroser and Sohal, 2007). Sin embargo, los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> envejecidos conservan la respuesta antioxidante mediada por NRF2, y de este modo mantienen bajos los niveles de ROS (**Figura 52**).

Además, observamos una discordancia entre los niveles de la proteína NRF2 y la expresión génica de *Gclc*, *Gclm* y *Ho-1*, en condiciones de ayuno. Ante tales resultados deducimos que NRF2 podría no ser el único regulador de la expresión génica de las enzimas redox, pues se ha visto que otros factores de transcripción como AP-1, también se encuentra implicado en la inducción génica de *Gclc* y *Gclm* (Lee and Johnson, 2004; Zhou et al., 2017).

Asimismo, vimos que había una discordancia entre la expresión génica y los niveles de la proteína de GCLm en los ratones WT ayunados. Así, estudiamos la posible correlación entre la expresión de la enzima GCLm y el miR-433, y si la expresión de este miARN estaba alterada durante el envejecimiento.

Nuestros resultados sugieren que la expresión hepática del miR-433 no varía en los ratones WT ayunados durante el envejecimiento, deduciendo que este miARN, en nuestro

caso, no explica las diferencias que hay entre la expresión del gen *Gclm* y su proteína. Sin embargo, la expresión del miR-433 disminuye en estado basal en los ratones envejecidos. Es curioso que la deficiencia de PASK en el proceso de envejecimiento mantenga elevada la expresión del miR-433, en condición basal. El miR-433 juega un papel fundamental en la regulación de la senescencia celular y la apoptosis, promoviendo mecanismos de reparación y regeneración en la vejez (Wang et al., 2015b).

La función mitocondrial se encuentra altamente alterada durante el envejecimiento, disminuyendo considerablemente la fosforilación oxidativa, la biogénesis mitocondrial y la mitofagia; y de este modo se acumulan múltiples mitocondrias disfuncionales (Chistiakov et al., 2014).

Nuestros resultados apuntan que los ratones envejecidos (tanto WT como *Pask*<sup>-/-</sup>) muestran, en estado basal, menor expresión hepática de *Pgc-1α*, *Nrf2* y *Ppar-γ*, respecto a los jóvenes. Asimismo, la expresión basal de *Cs* está extremadamente alterada (Sun et al., 2016). Sin embargo, aunque el contenido de ADNmt aumenta en los ratones WT envejecidos, la deficiencia de PASK lo reduce drásticamente hasta niveles indetectables. Este extremo, quizás pueda explicarse porque en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> existan mutaciones puntuales que impidan la interacción correcta con los oligonucleótidos utilizados en la amplificación.

Estudios de Malik y Czajka han señalado que la hiperglucemia propia de la diabetes, obesidad o el envejecimiento; ocasiona una producción alterada de ROS, originándose estrés oxidativo. De este modo, el estrés oxidativo conduce a aumentar descontroladamente la biogénesis mitocondrial como una respuesta adaptativa, y, por tanto, aumenta el contenido de ADNmt. Igualmente, el elevado contenido de ADNmt

favorece aún más la generación de ROS, ocasionando daños en el ADN y las proteínas; y originando disfunción mitocondrial (Malik and Czajka, 2013).

Se ha visto que la restricción calórica o la actividad física podría optimizar la función mitocondrial en el proceso de envejecimiento, pues se estimula los niveles de la proteína PGC-1 $\alpha$ , que modula las propiedades, la función y la capacidad oxidativa mitocondrial en músculo esquelético (Chistiakov et al., 2014). En cambio, nuestros datos señalan que el ayuno de 24 horas en ratones viejos disminuye considerablemente la expresión hepática de *Pgc-1 $\alpha$* , *Nrf2* y *Ppar- $\gamma$* . Es curioso que la deficiencia de PASK en el envejecimiento preserva la expresión génica de *Pgc-1 $\alpha$*  y potencia a *Nrf2* y *Ppar- $\gamma$* . Probablemente, esto podría ser un mecanismo compensatorio activado en edades avanzadas, con el fin de mantener apropiadamente la calidad y la función mitocondrial, pues destacamos que la expresión hepática de *Cs* es mayor en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup>.

Estudios previos han relacionado la elevada expresión génica de *Ppar- $\gamma$*  con la longevidad, pues se observaba una mejora en la sensibilidad a la insulina, previniendo el desarrollo de enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2 (Erol, 2007).

Por otra parte, el proceso de envejecimiento es controlado por la activación de la proteína AMPK, pues estimula la actividad de SIRT-1, FoxO, NRF2 y p53; siendo éstos primordiales en la supervivencia celular frente al estrés oxidativo y en el mantenimiento del balance energético (Salminen and Kaarniranta, 2012).

Nuestros datos apoyan lo ya corroborado por otros autores, que los ratones envejecidos tienden a disminuir los niveles hepáticos de la proteína SIRT-1 (Salminen and Kaarniranta, 2012; Yuan et al., 2016). Sin embargo, la deficiencia de PASK en el envejecimiento conserva los niveles de la proteína SIRT-1.

La activación de la SIRT-1 favorece la translocación nuclear y la actividad transcripcional del factor de transcripción FoxO3a, como respuesta a estímulos nocivos, activando mecanismos de supervivencia celular frente al estrés oxidativo. Así, la activación del complejo SIRT1-FoxO3a puede estar favorecido por la sobreexpresión de *FoxO3a* y ocasionar la alteración de respuestas proapoptóticas mediadas por el supresor de tumores p53. Éste se encuentra implicado en diversas patologías como el envejecimiento acelerado, pues inhibe la expresión génica de *FoxO3a* y *Sirt-1*, reprimiendo la supervivencia celular (Greer and Brunet, 2005).

El factor de transcripción FoxO3a ha sido considerado un mediador clave en las vías que participan en la longevidad, pues controla dos mecanismos fundamentales en la supervivencia frente al estrés oxidativo, estando potencialmente alterados en el proceso de envejecimiento: mecanismos de reparación frente a lesiones del ADN y mecanismos de detoxificación de las especies reactivas de oxígeno, pues induce la expresión de diversas enzimas antioxidantes. De este modo, impide el desarrollo de diversas patologías como la diabetes, el cáncer o el envejecimiento acelerado (Greer and Brunet, 2005; Morris, 2015).

Nuestros datos señalan que la expresión hepática de *FoxO3a* no es detectable, bajo condiciones de ayuno, en los ratones silvestres envejecidos. Este resultado está en concordancia con la baja expresión génica de *Sirt-1*. Así, se ha visto que el déficit de FoxO3a afecta al metabolismo de la glucosa (Castrillon et al., 2003) y fomenta el estrés celular (Tothova et al., 2007). De este modo, podríamos especular que el ayuno de 24 horas en ratones envejecidos podría inducir mecanismos proapoptóticos mediados por p53, pues los niveles de la proteína p53 están extremadamente elevados. La sobreactivación de p53 reduce la longevidad, pues detiene el ciclo celular y promueve la apoptosis (Greer and Brunet, 2005; Tyner et al., 2002). En cambio, la deficiencia de PASK en el envejecimiento

sobreexpresa el gen hepático *FoxO3a*, mientras que debilita *p53*, en condiciones de ayuno, deduciendo que *p53* y *FoxO3a* tienen efectos biológicos inversos, actuando antagónicamente para controlar los mecanismos de supervivencia y muerte celular (You et al., 2004). La sobreexpresión del gen *FoxO3a* mejora la sensibilidad a la insulina hepática en el envejecimiento, pues este factor de transcripción se expresa en los principales tejidos sensibles a la insulina (Banasik et al., 2011; Murtaza et al., 2017). Dichos resultados están en concordancia con la menor disminución (en algunas condiciones) de la expresión hepática de las enzimas antioxidantes (SOD-Mn, SOD-Cu/Zn, CAT y GPx) en los ratones *Pask*<sup>-/-</sup> envejecidos.

Por tanto, PASK en el envejecimiento quizás podría estar involucrado en los mecanismos hepáticos relacionados con la supervivencia celular, siendo mediados por el complejo SIRT1-*FoxO3a*, sin embargo, se necesitan estudios adicionales para obtener datos más concluyentes.

Aparte de la SIRT-1, la actividad de *p53* puede ser regulada post-transcripcionalmente por la proteína quinasa Akt. Ésta interviene en múltiples respuestas celulares como el crecimiento celular, la proliferación o la apoptosis. Además, se ha visto que la Akt juega un papel fundamental en el proceso de envejecimiento, mediante su implicación en el metabolismo energético (Nogueira et al., 2008). De este modo, la proteína Akt favorece la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno, como consecuencia de la actividad metabólica, y además altera los mecanismos antioxidantes, inhibiendo la expresión génica de *FoxO3a* y *Nrf2* (Nogueira et al., 2008). Asimismo, puede promover la senescencia celular, pues aumenta la estabilidad de la proteína *p53*, favoreciendo la detección del ciclo celular y la apoptosis (Aistle et al., 2012).

Nuestros datos señalan que el ayuno de 24 horas en los ratones envejecidos sobreactiva la proteína Akt. Se ha visto que elevados niveles de Akt activada están vinculados con la generación descontrolada de ROS, y con una mayor susceptibilidad a desarrollar patologías relacionadas con el estrés oxidativo (Astle et al., 2012). Por el contrario, la deficiencia de PASK en el envejecimiento reduce los niveles de Akt activada. Estos datos están en correlación con los bajos niveles hepáticos de ROS y la elevada expresión de genes de supervivencia y protección celular (*Nrf2* y *FoxO3a*). Estudios previos realizados con ratones deficientes en Akt (*Akt<sup>-/-</sup>*), mostraban niveles bajos de ROS y mayor capacidad de supervivencia celular en estos ratones (Nogueira et al., 2008). Además, especulamos que la deficiencia de PASK en los ratones envejecidos podría variar la sinergia que existe entre Akt y p53, pues observamos que los niveles de ambas proteínas son discordantes.

Además, p53 es clave en los mecanismos de reparación del ADN frente a daños oxidativos, donde también participa la proteína PCNA, ésta además involucrada en los procesos de proliferación celular (Gorbunova et al., 2007). Los mecanismos de reparación celular se alteran extremadamente durante el proceso de envejecimiento, causando la acumulación de sucesivas mutaciones exentas de ser corregidas (Gorbunova et al., 2007). La deficiencia de PASK en el envejecimiento mantiene elevada la proteína PCNA, sugiriéndose que los mecanismos hepáticos implicados en la reparación celular y la replicación del ADN podrían ser funcionales.

## **5. IMPLICACIÓN DE LA PASK EN LA ACCIÓN REGULADORA DE LA EXENDINA-4 EN EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO**

La edad aumenta el riesgo de padecer algún trastorno metabólico como la obesidad y la diabetes tipo 2. De este modo, análogos del péptido similar al glucagón tipo 1 como la

exendina-4, son utilizados para el tratamiento de este tipo de patologías, pues ejercen múltiples acciones metabólicas como la secreción postprandial de la insulina; la supresión del apetito, la ingesta de alimentos y el vaciamiento gástrico; favoreciendo la pérdida de peso corporal (Atalayer and Astbury, 2013).

Sin embargo, las consecuencias que tiene el proceso de envejecimiento sobre los efectos metabólicos del GLP-1 no han sido del todo aclaradas. Así, en nuestro trabajo de investigación, evaluamos el impacto que tiene el proceso de envejecimiento y la deficiencia de PASK en las acciones fisiológicas de la incretina GLP-1 (o su análogo exendina-4, en nuestro caso), en ratones C57BL/6J envejecidos con 18-20 meses de edad.

Estudios previos de MacIntosh y cols. indicaron que la concentración plasmática de GLP-1 no variaba durante el envejecimiento (MacIntosh et al., 2001). Sin embargo, otros autores señalaron que, tras una ingesta hiperlipídica, se liberaba mayor cantidad de GLP-1 en los pacientes viejos, respecto a los jóvenes, sugiriéndose que este péptido podría estar contribuyendo a la pérdida del apetito y a un menor consumo calórico en personas mayores (Di Francesco et al., 2010).

En nuestro caso, los ratones C57BL/6J viejos presentan menores niveles endógenos de GLP-1, con respecto a los jóvenes. Asimismo, la expresión hepática del receptor de GLP-1 (GLP-1R) desciende ~10 veces. Cabe destacar que ratones deficientes para este receptor (*Glp1r*<sup>-/-</sup>) muestran un incremento de la ingesta de alimentos (Burmeister et al., 2013). Además, el déficit de GLP-1R causa un deterioro en la tolerancia a la glucosa y en la sensibilidad a la insulina, favoreciendo el desarrollo de resistencia a la insulina (Fan et al., 2011). La intolerancia a la glucosa y la falta de secreción de insulina, en respuesta a glucosa, son unas de las principales consecuencias del proceso de envejecimiento (De Ore et al., 1997; Fan et al., 2011).

El GLP-1 ejerce su acción insulínica uniéndose al receptor GLP-1R en las células  $\beta$  pancreáticas, sin embargo, los efectos del GLP-1 a nivel de tejidos periféricos son independientes de su acción incretina (Tomas and Habener, 2010). Además, GLP-1 tiene un papel primordial a nivel mitocondrial (Tomas and Habener, 2010), por ello, nuestro estudio se ha centrado en analizar el efecto que tiene la vejez sobre la respuesta reguladora de la exendina-4 en el metabolismo oxidativo.

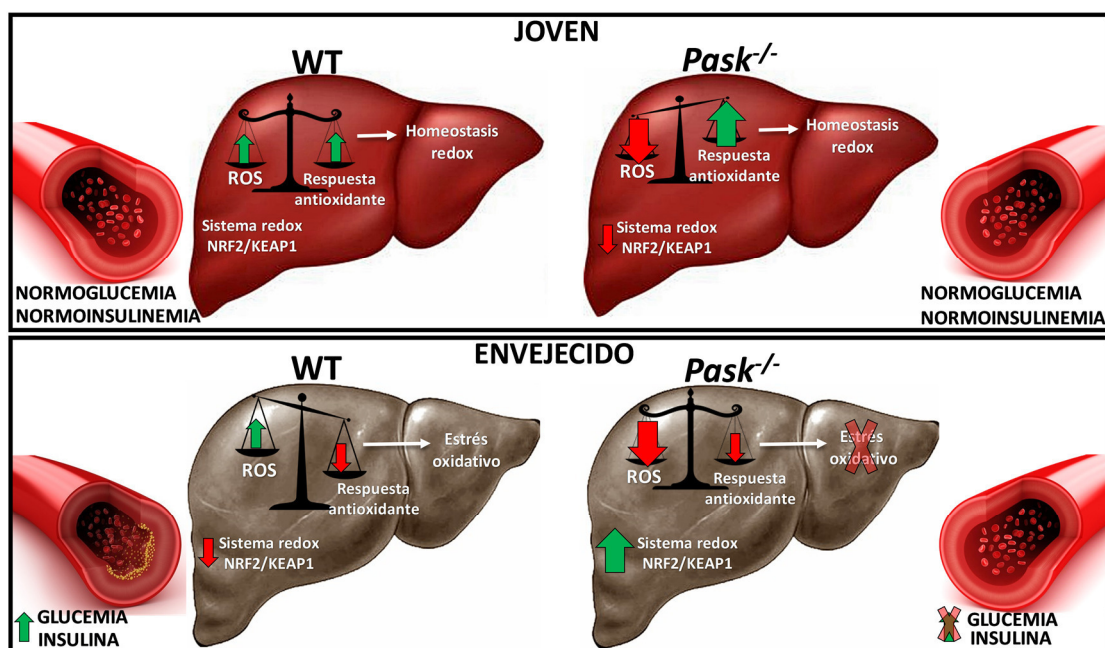
Nuestros datos apuntan a que la acción antioxidante de la exendina-4 tan intensa en edades jóvenes (3-5 meses) se revierte en edades más avanzadas (18-20 meses), ya que inhibe la expresión hepática de *Sod-Mn*, *Sod-Cu/Zn*, *Cat* y *Gpx*. Sin embargo, la deficiencia de PASK mejora la acción antioxidante de la exendina-4 en la expresión génica de *Sod-Cu/Zn* y *Gpx*, aunque continúa reprimida.

Asimismo, la administración subcutánea de exendina-4 en ratones envejecidos reprime la expresión génica de *Pgc-1 $\alpha$* , *Nrf2* y *Ppar- $\gamma$* , involucrados en la biogénesis y la función mitocondrial. Como hemos explicado anteriormente, la deficiencia de PASK en ratones de edades tempranas (3-5 meses) potencia el efecto de la exendina-4, regulando las propiedades y la función mitocondrial, pues eleva la expresión hepática de *Pgc-1 $\alpha$* , *Nrf2*, *Ppar- $\gamma$*  y *Cox-IV*, sin embargo, a edades más avanzadas (18-20 meses), la deficiencia de PASK inhibe completamente la acción moduladora de la exendina-4, revirtiendo su efecto, a nivel mitocondrial.

En resumen, nuestros resultados muestran que un control riguroso de los niveles de PASK es primordial para la regulación del estado redox en hígado, ya que su deficiencia aumenta: los sistemas de defensa antioxidante, la función y el contenido de ADN mitocondrial, y diversos mecanismos hepáticos implicados en reparación, supervivencia y



protección celular. Además, PASK participa en el desarrollo de las diversas alteraciones moleculares producidas durante el envejecimiento, dado que su deficiencia retarda o frena estas alteraciones (**Figura 52**), algo anteriormente no visto. Por último, PASK es clave en la acción reguladora de la exendina-4, en relación con la respuesta antioxidante y la función mitocondrial, al menos en hígado.



**Figura 52.** Esquema resumen de los efectos que ejercen el proceso de envejecimiento y la deficiencia de PASK en la regulación del estado redox hepático y de la homeostasis de la glucosa.

---

*CONCLUSIONES*



1. PASK es un sensor metabólico que controla el estado redox en hígado, pues su deficiencia altera la generación endógena de ATP y ROS, potencia la expresión génica de enzimas antioxidantes y, además, estimula la expresión de varios genes hepáticos implicados en la función y la biogénesis mitocondrial.
2. La deficiencia de PASK promueve la activación de mecanismos hepáticos de reparación, supervivencia y protección celular, en situaciones de ayuno prolongado (48 horas), a la par que controla la homeostasis redox celular, incrementando la expresión génica de la proteína desacetilasa SIRT-1, de los factores de transcripción NRF2 y FoxO3a, y sobreactivando las vías Akt y ERK1/2.
3. La PASK modula la regulación de la expresión génica, a nivel post-transcripcional por el miR-433, en respuesta a estados de ayuno/alimentación.
4. La expresión de la PASK en hígado está regulada bajo condiciones de alimentación y ayuno, siendo más baja en condiciones de ayuno e inhibida por la exendina-4.
5. La exendina-4 reduce la producción hepática de ROS, promoviendo la expresión génica de enzimas antioxidantes, y, además, induce la biogénesis, la función mitocondrial y mecanismos hepáticos de supervivencia y reparación celular; siendo su acción dependiente del estado nutricional y de PASK.
6. La expresión hepática de la PASK disminuye durante el proceso de envejecimiento, aunque, la deficiencia de PASK impide el desarrollo de la hiperglucemia e hiperinsulinemia, propias de la resistencia a la acción de la insulina que ocurre normalmente durante el envejecimiento.

7. La PASK en el proceso de envejecimiento controla los mecanismos de regulación del estado redox celular en hígado, pues los ratones deficientes en PASK mantienen bajos los niveles basales de ROS y frenan la disminución de la expresión génica de las enzimas antioxidantes (SOD-Mn, SOD-Cu/Zn, CAT y GPx) que ocurre con la edad. Además, conservan, en parte, las vías hepáticas de supervivencia y reparación celular, en respuesta a estímulos nocivos.
8. Las acciones reguladoras de la exendina-4, en relación con la respuesta antioxidante y la función mitocondrial en hígado, disminuyen durante el envejecimiento.

---

## *BIBLIOGRAFÍA*



- Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M.L., Perez-Martos, A., and Enriquez, J.A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32, 529-539.
- Alcendor, R.R., Gao, S., Zhai, P., Zablocki, D., Holle, E., Yu, X., Tian, B., Wagner, T., Vatner, S.F., and Sadoshima, J. (2007). Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res* 100, 1512-1521.
- Almeida, M.I., Reis, R.M., and Calin, G.A. (2011). MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat Res* 717, 1-8.
- Alvarez, E., Martinez, M.D., Roncero, I., Chowen, J.A., Garcia-Cuartero, B., Gispert, J.D., Sanz, C., Vazquez, P., Maldonado, A., de Caceres, J., *et al.* (2005). The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. *J Neurochem* 92, 798-806.
- Alvarez, E., Roncero, I., Chowen, J.A., Thorens, B., and Blazquez, E. (1996). Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain. *J Neurochem* 66, 920-927.
- Amezcu, C.A., Harper, S.M., Rutter, J., and Gardner, K.H. (2002). Structure and interactions of PAS kinase N-terminal PAS domain: model for intramolecular kinase regulation. *Structure* 10, 1349-1361.
- Amori, R.E., Lau, J., and Pittas, A.G. (2007). Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 298, 194-206.
- An, R., da Silva Xavier, G., Hao, H.X., Semplici, F., Rutter, J., and Rutter, G.A. (2006). Regulation by Per-Arnt-Sim (PAS) kinase of pancreatic duodenal homeobox-1 nuclear import in pancreatic beta-cells. *Biochem Soc Trans* 34, 791-793.
- Anson, R.M., Guo, Z., de Cabo, R., Iyun, T., Rios, M., Hagepanos, A., Ingram, D.K., Lane, M.A., and Mattson, M.P. (2003). Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6216-6220.
- Astle, M.V., Hannan, K.M., Ng, P.Y., Lee, R.S., George, A.J., Hsu, A.K., Haupt, Y., Hannan, R.D., and Pearson, R.B. (2012). AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene* 31, 1949-1962.
- Atalayer, D., and Astbury, N.M. (2013). Anorexia of aging and gut hormones. *Aging Dis* 4, 264-275.
- Athauda, D., and Foltynie, T. (2016). The glucagon-like peptide 1 (GLP) receptor as a therapeutic target in Parkinson's disease: mechanisms of action. *Drug Discov Today* 21, 802-818.
- Austin, S., and St-Pierre, J. (2012). PGC1alpha and mitochondrial metabolism-emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J Cell Sci* 125, 4963-4971.
- Aviv, V., Meivar-Levy, I., Rachmut, I.H., Rubinek, T., Mor, E., and Ferber, S. (2009). Exendin-4 promotes liver cell proliferation and enhances the PDX-1-induced liver to pancreas transdifferentiation process. *J Biol Chem* 284, 33509-33520.



- Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Dagaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., *et al.* (2003). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* 278, 17190-17197.
- Baggio, L.L., and Drucker, D.J. (2007). Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132, 2131-2157.
- Bai, W., and Zhang, X. (2016). Nucleus or cytoplasm? The mysterious case of SIRT1's subcellular localization. *Cell Cycle* 15, 3337-3338.
- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209-1211.
- Banasik, K., Ribel-Madsen, R., Gjesing, A.P., Wegner, L., Andersson, A., Poulsen, P., Borglykke, A., Witte, D.R., Pedersen, O., Hansen, T., *et al.* (2011). The FOXO3A rs2802292 G-allele associates with improved peripheral and hepatic insulin sensitivity and increased skeletal muscle-FOXO3A mRNA expression in twins. *J Clin Endocrinol Metab* 96, E119-124.
- Bartosz, G. (2009). Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol* 77, 1303-1315.
- Barzilai, N., Huffman, D.M., Muzumdar, R.H., and Bartke, A. (2012). The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes* 61, 1315-1322.
- Bauer, M., Hamm, A.C., Bonaus, M., Jacob, A., Jaekel, J., Schorle, H., Pankratz, M.J., and Katzenberger, J.D. (2004). Starvation response in mouse liver shows strong correlation with life-span-prolonging processes. *Physiol Genomics* 17, 230-244.
- Bernabé Salazar A, N.C.J., Pallarés Martínez FJ (2015). Hígado. Organización del hígado. In (Universidad de Murcia), p. 5.
- Berridge, M.V., Herst, P.M., and Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review* 11, 127-152.
- Billecke, C., Finniss, S., Tahash, L., Miller, C., Mikkelsen, T., Farrell, N.P., and Bogler, O. (2006). Polynuclear platinum anticancer drugs are more potent than cisplatin and induce cell cycle arrest in glioma. *Neuro Oncol* 8, 215-226.
- Biolabs, C. (2017). Product Manual. OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit (Green Fluorescence). Cell Biolabs, ed. (San Diego, CA).
- Bratic, A., and Larsson, N.G. (2013). The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest* 123, 951-957.
- Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., *et al.* (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303, 2011-2015.
- Burmeister, M.A., Ayala, J., Drucker, D.J., and Ayala, J.E. (2013). Central glucagon-like peptide 1 receptor-induced anorexia requires glucose metabolism-mediated suppression of AMPK and is impaired by central fructose. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304, E677-685.

- Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *Anal Biochem* **112**, 195-203.
- Cabistol, E. (2014). Oxidación celular y envejecimiento. Radicales libres. In SEBBM DIVULGACIÓN (Lleida, España).
- Cai, Y., Wang, Q., Ling, Z., Pipeleers, D., McDermott, P., Pende, M., Heimberg, H., and Van de Castele, M. (2008). Akt activation protects pancreatic beta cells from AMPK-mediated death through stimulation of mTOR. *Biochem Pharmacol* **75**, 1981-1993.
- Canto, C., and Auwerx, J. (2009). PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol* **20**, 98-105.
- Cardon, C.M., and Rutter, J. (2012). PAS kinase: integrating nutrient sensing with nutrient partitioning. *Semin Cell Dev Biol* **23**, 626-630.
- Castrillon, D.H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J.W., and DePinho, R.A. (2003). Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* **301**, 215-218.
- Catalano, K.J., Bergman, R.N., and Ader, M. (2005). Increased susceptibility to insulin resistance associated with abdominal obesity in aging rats. *Obes Res* **13**, 11-20.
- Colerangle, J. (2008). Pharmacology/toxicology review and evaluation, C.f.d.e.a. research, ed.
- Corona, J.C., and Duchon, M.R. (2016). PPARgamma as a therapeutic target to rescue mitochondrial function in neurological disease. *Free Radic Biol Med* **100**, 153-163.
- Cui, H., Kong, Y., and Zhang, H. (2012). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct* **2012**, 646354.
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J.M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 49-63.
- Chae, Y.N., Kim, T.H., Kim, M.K., Shin, C.Y., Jung, I.H., Sohn, Y.S., and Son, M.H. (2015). Beneficial Effects of Evogliptin, a Novel Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor, on Adiposity with Increased Ppargc1a in White Adipose Tissue in Obese Mice. *PLoS One* **10**, e0144064.
- Chan, J.Y., and Kwong, M. (2000). Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein. *Biochim Biophys Acta* **1517**, 19-26.
- Chen, W., Jiang, T., Wang, H., Tao, S., Lau, A., Fang, D., and Zhang, D.D. (2012). Does Nrf2 contribute to p53-mediated control of cell survival and death?. *Antioxid Redox Signal* **17**, 1670-1675.
- Cheng, X., Ku, C.H., and Siow, R.C. (2013). Regulation of the Nrf2 antioxidant pathway by microRNAs: New players in micromanaging redox homeostasis. *Free Radic Biol Med* **64**, 4-11.
- Chiarugi, P. (2008). From anchorage dependent proliferation to survival: lessons from redox signalling. *IUBMB Life* **60**, 301-307.

- Chistiakov, D.A., Sobenin, I.A., Revin, V.V., Orekhov, A.N., and Bobryshev, Y.V. (2014). Mitochondrial aging and age-related dysfunction of mitochondria. *Biomed Res Int* 2014, 238463.
- da Silva Xavier, G., Farhan, H., Kim, H., Caxaria, S., Johnson, P., Hughes, S., Bugliani, M., Marselli, L., Marchetti, P., Birzele, F., *et al.* (2011). Per-arnt-sim (PAS) domain-containing protein kinase is downregulated in human islets in type 2 diabetes and regulates glucagon secretion. *Diabetologia* 54, 819-827.
- Dagda, R.K., Zhu, J., Kulich, S.M., and Chu, C.T. (2008). Mitochondrially localized ERK2 regulates mitophagy and autophagic cell stress: implications for Parkinson's disease. *Autophagy* 4, 770-782.
- de Almeida, A., Ribeiro, T.P., and de Medeiros, I.A. (2017). Aging: Molecular Pathways and Implications on the Cardiovascular System. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 7941563.
- De Ore, K., Greig, N.H., Holloway, H.W., Wang, Y., Perfetti, R., and Egan, J.M. (1997). The effects of GLP-1 on insulin release in young and old rats in the fasting state and during an intravenous glucose tolerance test. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 52, B245-249.
- Devlin, T.M. (2004). *Bioquímica*, 4ª edn (Barcelona).
- Di Francesco, V., Barazzoni, R., Bissoli, L., Fantin, F., Rizzotti, P., Residori, L., Antonioli, A., Graziani, M.S., Zanetti, M., Bosello, O., *et al.* (2010). The quantity of meal fat influences the profile of postprandial hormones as well as hunger sensation in healthy elderly people. *J Am Med Dir Assoc* 11, 188-193.
- Dominy, J.E., and Puigserver, P. (2013). Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
- Dorland (2012). *Dorland's illustrated medical dictionary*. In *Dorland's illustrated medical dictionary* (Philadelphia: Elsevier/Saunders), pp. 285.
- Eckhardt, K., Troger, J., Reissmann, J., Katschinski, D.M., Wagner, K.F., Stengel, P., Paasch, U., Hunziker, P., Borter, E., Barth, S., *et al.* (2007). Male germ cell expression of the PAS domain kinase PASKIN and its novel target eukaryotic translation elongation factor eEF1A1. *Cell Physiol Biochem* 20, 227-240.
- Erol, A. (2007). The Functions of PPARs in Aging and Longevity. *PPAR Res* 2007, 39654.
- Espinosa-Diez, C., Fierro-Fernandez, M., Sanchez-Gomez, F., Rodriguez-Pascual, F., Alique, M., Ruiz-Ortega, M., Beraza, N., Martinez-Chantar, M.L., Fernandez-Hernando, C., and Lamas, S. (2015). Targeting of Gamma-Glutamyl-Cysteine Ligase by miR-433 Reduces Glutathione Biosynthesis and Promotes TGF-beta-Dependent Fibrogenesis. *Antioxid Redox Signal* 23, 1092-1105.
- Fainstein, M.K. (2007). Nrf2: LA HISTORIA DE UN NUEVO FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN QUE RESPONDE A ESTRÉS OXIDATIVO. *REB* 26, 18-25.
- Fan, R., Kang, Z., He, L., Chan, J., and Xu, G. (2011). Exendin-4 improves blood glucose control in both young and aging normal non-diabetic mice, possible contribution of beta cell independent effects. *PLoS One* 6, e20443.

- Fan, X., Chen, P., Tan, H., Zeng, H., Jiang, Y., Wang, Y., Wang, Y., Hou, X., Bi, H., and Huang, M. (2014). Dynamic and coordinated regulation of KEAP1-NRF2-ARE and p53/p21 signaling pathways is associated with acetaminophen injury responsive liver regeneration. *Drug Metab Dispos* 42, 1532-1539.
- Fontes, G., Semache, M., Hagman, D.K., Tremblay, C., Shah, R., Rhodes, C.J., Rutter, J., and Poitout, V. (2009). Involvement of Per-Arnt-Sim Kinase and extracellular-regulated kinases-1/2 in palmitate inhibition of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 58, 2048-2058.
- Gerhart-Hines, Z., Rodgers, J.T., Bare, O., Lerin, C., Kim, S.H., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., Wu, Z., and Puigserver, P. (2007). Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *EMBO J* 26, 1913-1923.
- Gilda, J.E., and Gomes, A.V. (2013). Stain-Free total protein staining is a superior loading control to beta-actin for Western blots. *Anal Biochem* 440, 186-188.
- Goralska, J., Sliwa, A., Gruca, A., Razny, U., Chojnacka, M., Polus, A., Solnica, B., and Malczewska-Malec, M. (2017). Glucagon-like peptide-1 receptor agonist stimulates mitochondrial bioenergetics in human adipocytes. *Acta Biochim Pol* 64, 423-429.
- Gorbunova, V., Seluanov, A., Mao, Z., and Hine, C. (2007). Changes in DNA repair during aging. *Nucleic Acids Res* 35, 7466-7474.
- Gottlieb, R.A., and Gustafsson, A.B. (2011). Mitochondrial turnover in the heart. *Biochim Biophys Acta* 1813, 1295-1301.
- Greer, E.L., and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24, 7410-7425.
- Greig, N.H., Holloway, H.W., De Ore, K.A., Jani, D., Wang, Y., Zhou, J., Garant, M.J., and Egan, J.M. (1999). Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations. *Diabetologia* 42, 45-50.
- Grose, J.H., and Rutter, J. (2010). The role of PAS kinase in PASSing the glucose signal. *Sensors (Basel)* 10, 5668-5682.
- Gu, J., Wei, Q., Zheng, H., Meng, X., Zhang, J., and Wang, D. (2016). Exendin-4 Promotes Survival of Mouse Pancreatic beta-Cell Line in Lipotoxic Conditions, through the Extracellular Signal-Related Kinase 1/2 Pathway. *J Diabetes Res* 2016, 5294025.
- Guo, Y.L., Chakraborty, S., Rajan, S.S., Wang, R., and Huang, F. (2010). Effects of oxidative stress on mouse embryonic stem cell proliferation, apoptosis, senescence, and self-renewal. *Stem Cells Dev* 19, 1321-1331.
- Gurd, B.J., Yoshida, Y., McFarlan, J.T., Holloway, G.P., Moyes, C.D., Heigenhauser, G.J., Spriet, L., and Bonen, A. (2011). Nuclear SIRT1 activity, but not protein content, regulates mitochondrial biogenesis in rat and human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301, R67-75.

- Hao, H.X., Cardon, C.M., Swiatek, W., Cooksey, R.C., Smith, T.L., Wilde, J., Boudina, S., Abel, E.D., McClain, D.A., and Rutter, J. (2007). PAS kinase is required for normal cellular energy balance. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 15466-15471.
- Hao, H.X., and Rutter, J. (2008). The role of PAS kinase in regulating energy metabolism. *IUBMB Life* *60*, 204-209.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* *11*, 298-300.
- Harman, D. (1972). The biologic clock: the mitochondria?. *J Am Geriatr Soc* *20*, 145-147.
- Hayakawa, J., Ohmichi, M., Kurachi, H., Ikegami, H., Kimura, A., Matsuoka, T., Jikihara, H., Mercola, D., and Murata, Y. (1999). Inhibition of extracellular signal-regulated protein kinase or c-Jun N-terminal protein kinase cascade, differentially activated by cisplatin, sensitizes human ovarian cancer cell line. *J Biol Chem* *274*, 31648-31654.
- Heit, C., Marshall, S., Singh, S., Yu, X., Charkoftaki, G., Zhao, H., Orlicky, D.J., Fritz, K.S., Thompson, D.C., and Vasiliou, V. (2017). Catalase deletion promotes prediabetic phenotype in mice. *Free Radic Biol Med* *103*, 48-56.
- Helmy, M.M. (2012). Potential hepato-protective effect of alpha-tocopherol or simvastatin in aged rats. *Pharmacol Rep* *64*, 698-705.
- Hnasko, R.M. (2015). ELISA. *Methods and protocols* (Springer Protocols).
- Hoehn, K.L., Salmon, A.B., Hohnen-Behrens, C., Turner, N., Hoy, A.J., Maghazal, G.J., Stocker, R., Van Remmen, H., Kraegen, E.W., Cooney, G.J., *et al.* (2009). Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 17787-17792.
- Holmstrom, K.M., Baird, L., Zhang, Y., Hargreaves, I., Chalasani, A., Land, J.M., Stanyer, L., Yamamoto, M., Dinkova-Kostova, A.T., and Abramov, A.Y. (2013). Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration. *Biol Open* *2*, 761-770.
- Houtkooper, R.H., Argmann, C., Houten, S.M., Canto, C., Jenning, E.H., Andreux, P.A., Thomas, C., Doenlen, R., Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2011). The metabolic footprint of aging in mice. *Sci Rep* *1*, 134.
- Huang, M., Xu, Q., Mitsui, K., and Xu, Z. (2014). PSK1 regulates expression of SOD1 involved in oxidative stress tolerance in yeast. *FEMS Microbiol Lett* *350*, 154-160.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* *425*, 686-691.
- Hurtado-Carneiro, V., Roncero, I., Blazquez, E., Alvarez, E., and Sanz, C. (2013a). PAS kinase as a nutrient sensor in neuroblastoma and hypothalamic cells required for the normal expression and activity of other cellular nutrient and energy sensors. *Mol Neurobiol* *48*, 904-920.
- Hurtado-Carneiro, V., Roncero, I., Blazquez, E., Álvarez, E., and Sanz, C. (2013b). Glucagon-like peptide-1 and its implications in obesity. In *Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases* M Fedele, editor INTECH, Italy.

- Hurtado-Carneiro, V., Roncero, I., Egger, S.S., Wenger, R.H., Blazquez, E., Sanz, C., and Alvarez, E. (2014). PAS kinase is a nutrient and energy sensor in hypothalamic areas required for the normal function of AMPK and mTOR/S6K1. *Mol Neurobiol* 50, 314-326.
- Hurtado-Carneiro, V., Sanz, C., Roncero, I., Vazquez, P., Blazquez, E., and Alvarez, E. (2012). Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) can reverse AMP-activated protein kinase (AMPK) and S6 kinase (P70S6K) activities induced by fluctuations in glucose levels in hypothalamic areas involved in feeding behaviour. *Mol Neurobiol* 45, 348-361.
- Jakubowski, W., and Bartosz, G. (2000). 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure?. *Cell Biol Int* 24, 757-760.
- Janssen, P., Rotondo, A., Mule, F., and Tack, J. (2013). Review article: a comparison of glucagon-like peptides 1 and 2. *Aliment Pharmacol Ther* 37, 18-36.
- Ji, L.L., Dillon, D., and Wu, E. (1990). Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol* 258, R918-923.
- Jornayvaz, F.R., and Shulman, G.I. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem* 47, 69-84.
- Juhasz, A., Markel, S., Gaur, S., Liu, H., Lu, J., Jiang, G., Wu, X., Antony, S., Wu, Y., Melillo, G., *et al.* (2017). NADPH oxidase 1 supports proliferation of colon cancer cells by modulating reactive oxygen species-dependent signal transduction. *J Biol Chem* 292, 7866-7887.
- Kaliman, P.A., and Nikitchenko, I.V. (1989). [Activity of key enzymes of heme metabolism and the content of several hemoproteins in the liver of rats of various ages]. *Ukr Biokhim Zh* (1978) 61, 75-78.
- Kang, M.Y., Oh, T.J., and Cho, Y.M. (2015). Glucagon-Like Peptide-1 Increases Mitochondrial Biogenesis and Function in INS-1 Rat Insulinoma Cells. *Endocrinol Metab (Seoul)* 30, 216-220.
- Kapoor, V.K. (2015). Liver Anatomy. In *Medscape (Texas, EEUU: Thomas R Gest)*.
- Karnkowska, A., Vacek, V., Zubacova, Z., Treitli, S.C., Petrzalkova, R., Eme, L., Novak, L., Zarsky, V., Barlow, L.D., Herman, E.K., *et al.* (2016). A Eukaryote without a Mitochondrial Organelle. *Curr Biol* 26, 1274-1284.
- Katschinski, D.M., Marti, H.H., Wagner, K.F., Shibata, J., Eckhardt, K., Martin, F., Depping, R., Paasch, U., Gassmann, M., Ledermann, B., *et al.* (2003). Targeted disruption of the mouse PAS domain serine/threonine kinase PASKIN. *Mol Cell Biol* 23, 6780-6789.
- Kelman, Z. (1997). PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 14, 629-640.
- Khorsandi, L., Saremy, S., Khodadadi, A., and Dehbashi, F. (2016). Effects of Exendine-4 on The Differentiation of Insulin Producing Cells from Rat Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell J* 17, 720-729.
- Kietzmann, T. (2017). Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox Biol* 11, 622-630.

- Kikani, C.K., Antonyamy, S.A., Bonanno, J.B., Romero, R., Zhang, F.F., Russell, M., Gheyi, T., Lizuka, M., Emtage, S., Sauder, J.M., *et al.* (2010). Structural bases of PAS domain-regulated kinase (PASK) activation in the absence of activation loop phosphorylation. *J Biol Chem* 285, 41034-41043.
- Kim, I.H., Kisseleva, T., and Brenner, D.A. (2015). Aging and liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 31, 184-191.
- Kim, Y.Y., Jee, H.J., Um, J.H., Kim, Y.M., Bae, S.S., and Yun, J. (2017). Cooperation between p21 and Akt is required for p53-dependent cellular senescence. *Aging Cell* 16, 1094-1103.
- Klotz, L.O., Sanchez-Ramos, C., Prieto-Arroyo, I., Urbanek, P., Steinbrenner, H., and Monsalve, M. (2015). Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol* 6, 51-72.
- Kondoh, M., Kamada, K., Kuronaga, M., Higashimoto, M., Takiguchi, M., Watanabe, Y., and Sato, M. (2003). Antioxidant property of metallothionein in fasted mice. *Toxicol Lett* 143, 301-306.
- Kuhlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol* 13, 89.
- Lackner, L.L. (2014). Shaping the dynamic mitochondrial network. *BMC Biol* 12, 35.
- Lavin, M.F., and Gueven, N. (2006). The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* 13, 941-950.
- Lee, C.Y. (2016). Glucagon-Like Peptide-1 Formulation--the Present and Future Development in Diabetes Treatment. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 118, 173-180.
- Lee, J.M., and Johnson, J.A. (2004). An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 37, 139-143.
- Lee, Y.J., and Shacter, E. (2000). Hydrogen peroxide inhibits activation, not activity, of cellular caspase-3 in vivo. *Free Radic Biol Med* 29, 684-692.
- Lennon, S.V., Martin, S.J., and Cotter, T.G. (1991). Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* 24, 203-214.
- Leung, L., Kwong, M., Hou, S., Lee, C., and Chan, J.Y. (2003). Deficiency of the Nrf1 and Nrf2 transcription factors results in early embryonic lethality and severe oxidative stress. *J Biol Chem* 278, 48021-48029.
- Levy, S., and Forman, H.J. (2010). C-Myc is a Nrf2-interacting protein that negatively regulates phase II genes through their electrophile responsive elements. *IUBMB Life* 62, 237-246.
- Li, H., Jia, Z., Li, G., Zhao, X., Sun, P., Wang, J., Fan, Z., and Lv, G. (2015). Neuroprotective effects of exendin-4 in rat model of spinal cord injury via inhibiting mitochondrial apoptotic pathway. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 4837-4843.
- Li, Z., Zhou, Z., Huang, G., Hu, F., Xiang, Y., and He, L. (2013). Exendin-4 protects mitochondria from reactive oxygen species induced apoptosis in pancreatic Beta cells. *PLoS One* 8, e76172.

- Lin, J., Wu, P.H., Tarr, P.T., Lindenberg, K.S., St-Pierre, J., Zhang, C.Y., Mootha, V.K., Jager, S., Vianna, C.R., Reznick, R.M., *et al.* (2004). Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 $\alpha$  null mice. *Cell* 119, 121-135.
- Liu, B., Chen, Y., and St Clair, D.K. (2008). ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic Biol Med* 44, 1529-1535.
- Liu, D., and Xu, Y. (2011). p53, oxidative stress, and aging. *Antioxid Redox Signal* 15, 1669-1678.
- Liu, R., and Choi, J. (2000). Age-associated decline in gamma-glutamylcysteine synthetase gene expression in rats. *Free Radic Biol Med* 28, 566-574.
- Liu, Y., Qi, W., Richardson, A., Van Remmen, H., Ikeno, Y., and Salmon, A.B. (2013). Oxidative damage associated with obesity is prevented by overexpression of CuZn- or Mn-superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun* 438, 78-83.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Lu, Z., and Xu, S. (2006). ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life* 58, 621-631.
- Lushchak, V.I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 224, 164-175.
- Macedo-Márquez, A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces Cerevisiae*. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químicas-Biológicas* 15, 97-103.
- MacIntosh, C.G., Horowitz, M., Verhagen, M.A., Smout, A.J., Wishart, J., Morris, H., Goble, E., Morley, J.E., and Chapman, I.M. (2001). Effect of small intestinal nutrient infusion on appetite, gastrointestinal hormone release, and gastric myoelectrical activity in young and older men. *Am J Gastroenterol* 96, 997-1007.
- Malik, A.N., and Czajka, A. (2013). Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction?. *Mitochondrion* 13, 481-492.
- Marchi, S., Patergnani, S., and Pinton, P. (2014). The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: one touch, multiple functions. *Biochim Biophys Acta* 1837, 461-469.
- Mari, M., Colell, A., Morales, A., von Montfort, C., Garcia-Ruiz, C., and Fernandez-Checa, J.C. (2010). Redox control of liver function in health and disease. *Antioxid Redox Signal* 12, 1295-1331.
- Mattson, M.P., and Wan, R. (2005). Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. *J Nutr Biochem* 16, 129-137.
- McCubrey, J.A., Lahair, M.M., and Franklin, R.A. (2006). Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal* 8, 1775-1789.
- Menon, S.G., and Goswami, P.C. (2007). A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene* 26, 1101-1109.



- Mitchell, S.J., Madrigal-Matute, J., Scheibye-Knudsen, M., Fang, E., Aon, M., Gonzalez-Reyes, J.A., Cortassa, S., Kaushik, S., Gonzalez-Freire, M., Patel, B., *et al.* (2016). Effects of Sex, Strain, and Energy Intake on Hallmarks of Aging in Mice. *Cell Metab* 23, 1093-1112.
- Moraes, C.T., DiMauro, S., Zeviani, M., Lombes, A., Shanske, S., Miranda, A.F., Nakase, H., Bonilla, E., Werneck, L.C., Servidei, S., *et al.* (1989). Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 320, 1293-1299.
- Morris, B.J.W., D. C.; Donlon, T. A.; Willcox, B. J. (2015). FOXO3: A Major Gene for Human Longevity. A Mini-Review. *Gerontology* 61, 515-525.
- Mourier, A., Motori, E., Brandt, T., Lagouge, M., Atanassov, I., Galinier, A., Rappl, G., Brodesser, S., Hultenby, K., Dieterich, C., *et al.* (2015). Mitofusin 2 is required to maintain mitochondrial coenzyme Q levels. *J Cell Biol* 208, 429-442.
- Murata, H., Takamatsu, H., Liu, S., Kataoka, K., Huh, N.H., and Sakaguchi, M. (2015). NRF2 Regulates PINK1 Expression under Oxidative Stress Conditions. *PLoS One* 10, e0142438.
- Murtaza, G., Khan, A.K., Rashid, R., Muneer, S., and Chen, J. (2017). FOXO Transcriptional Factors and Long-Term Living. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 3494289.
- Neupert, W., and Herrmann, J.M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76, 723-749.
- Nogueira, V., Park, Y., Chen, C.C., Xu, P.Z., Chen, M.L., Tonic, I., Unterman, T., and Hay, N. (2008). Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell* 14, 458-470.
- Oh, Y.S., and Jun, H.S. (2017). Effects of Glucagon-Like Peptide-1 on Oxidative Stress and Nrf2 Signaling. *Int J Mol Sci* 19.
- Palikaras, K., Lionaki, E., and Tavernarakis, N. (2015). Balancing mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain energy metabolism homeostasis. *Cell Death Differ* 22, 1399-1401.
- Park, C.W., Kim, H.W., Ko, S.H., Lim, J.H., Ryu, G.R., Chung, H.W., Han, S.W., Shin, S.J., Bang, B.K., Breyer, M.D., *et al.* (2007). Long-term treatment of glucagon-like peptide-1 analog exendin-4 ameliorates diabetic nephropathy through improving metabolic anomalies in db/db mice. *J Am Soc Nephrol* 18, 1227-1238.
- Park, J.Y., Wang, P.Y., Matsumoto, T., Sung, H.J., Ma, W., Choi, J.W., Anderson, S.A., Leary, S.C., Balaban, R.S., Kang, J.G., *et al.* (2009). p53 improves aerobic exercise capacity and augments skeletal muscle mitochondrial DNA content. *Circ Res* 105, 705-712, 711 p following 712.
- Pérez-García, A., Dongil, P., Hurtado-Carneiro, V., Blázquez, E., Sanz, C., and Álvarez, E. (en prensa). High-Fat Diet alters PAS kinase regulation by fasting and feeding in liver. *The Journal of nutritional biochemistry*.
- Petersen, K.E., Rakićovski, G., Raun, K., and Lykkesfeldt, J. (2016). Does Glucagon-like Peptide-1 Ameliorate Oxidative Stress in Diabetes? Evidence Based on Experimental and Clinical Studies. *Curr Diabetes Rev* 12, 331-358.
- Piñeiro-Carrero, V.M., and Piñeiro, E.O. (2004). Liver. *Pediatrics* 113.

- Reichert, A.S., and Neupert, W. (2004). Mitochondriomics or what makes us breathe. *Trends Genet* 20, 555-562.
- Robbins, D., and Zhao, Y. (2012). Oxidative Stress Induced by MnSOD-p53 Interaction: Pro or Anti-Tumorigenic?. *J Signal Transduct* 2012, 101465.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434, 113-118.
- Rosenberg, M.I., and Parkhurst, S.M. (2002). Drosophila Sir2 is required for heterochromatic silencing and by euchromatic Hairy/E(Spl) bHLH repressors in segmentation and sex determination. *Cell* 109, 447-458.
- Sahin, E., Colla, S., Liesa, M., Moslehi, J., Muller, F.L., Guo, M., Cooper, M., Kotton, D., Fabian, A.J., Walkey, C., *et al.* (2011). Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* 470, 359-365.
- Sahin, E., and DePinho, R.A. (2012). Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 397-404.
- Salazar, M., Rojo, A.I., Velasco, D., de Sagarra, R.M., and Cuadrado, A. (2006). Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 281, 14841-14851.
- Saleem, A., Adhietty, P.J., and Hood, D.A. (2009). Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle. *Physiol Genomics* 37, 58-66.
- Salminen, A., and Kaarniranta, K. (2012). AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing Res Rev* 11, 230-241.
- Sandstrom, M.E., Zhang, S.J., Bruton, J., Silva, J.P., Reid, M.B., Westerblad, H., and Katz, A. (2006). Role of reactive oxygen species in contraction-mediated glucose transport in mouse skeletal muscle. *J Physiol* 575, 251-262.
- Sebastian, D., Hernandez-Alvarez, M.I., Segales, J., Sorianello, E., Munoz, J.P., Sala, D., Waget, A., Liesa, M., Paz, J.C., Gopalacharyulu, P., *et al.* (2012). Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 5523-5528.
- Sebastian, D., Palacin, M., and Zorzano, A. (2017). Mitochondrial Dynamics: Coupling Mitochondrial Fitness with Healthy Aging. *Trends Mol Med* 23, 201-215.
- Semplici, F., Vaxillaire, M., Fogarty, S., Semache, M., Bonnefond, A., Fontes, G., Philippe, J., Meur, G., Diraison, F., Sessions, R.B., *et al.* (2011). Human mutation within Per-Arnt-Sim (PAS) domain-containing protein kinase (PASK) causes basal insulin hypersecretion. *J Biol Chem* 286, 44005-44014.
- Shih, P.H., and Yen, G.C. (2007). Differential expressions of antioxidant status in aging rats: the role of transcriptional factor Nrf2 and MAPK signaling pathway. *Biogerontology* 8, 71-80.

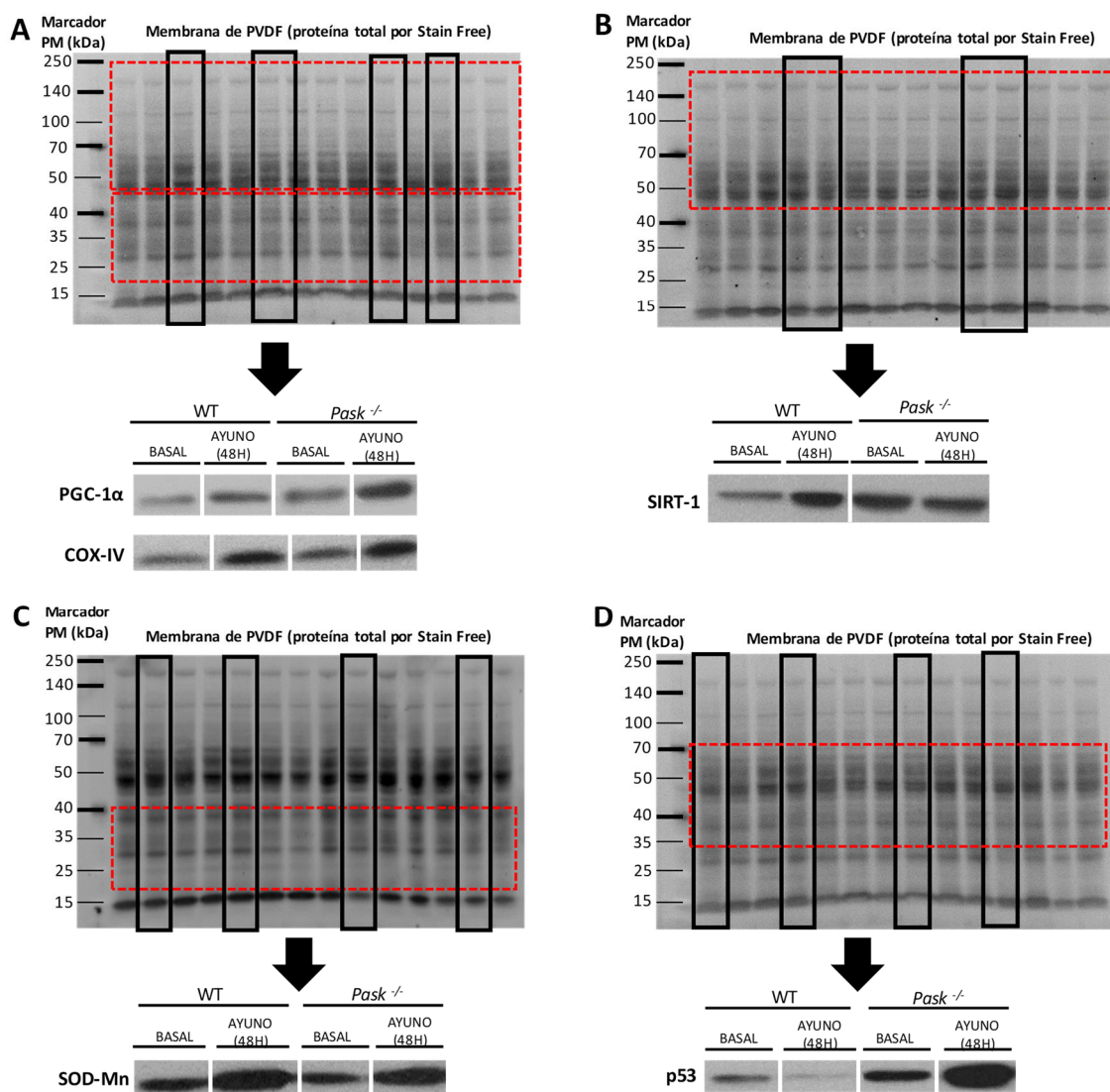
- Sinclair, E.M., and Drucker, D.J. (2005). Proglucagon-derived peptides: mechanisms of action and therapeutic potential. *Physiology (Bethesda)* 20, 357-365.
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jager, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., *et al.* (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127, 397-408.
- St-Pierre, J., Lin, J., Krauss, S., Tarr, P.T., Yang, R., Newgard, C.B., and Spiegelman, B.M. (2003). Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol Chem* 278, 26597-26603.
- Sudheesh, N.P., Ajith, T.A., Ramnath, V., and Janardhanan, K.K. (2010). Therapeutic potential of *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst. against the declined antioxidant status in the mitochondria of post-mitotic tissues of aged mice. *Clin Nutr* 29, 406-412.
- Suliman, H.B., and Piantadosi, C.A. (2014). Mitochondrial biogenesis: regulation by endogenous gases during inflammation and organ stress. *Curr Pharm Des* 20, 5653-5662.
- Sun, N., Youle, R.J., and Finkel, T. (2016). The Mitochondrial Basis of Aging. *Mol Cell* 61, 654-666.
- Swamy, S.M., Rajasekaran, N.S., and Thannickal, V.J. (2016). Nuclear Factor-Erythroid-2-Related Factor 2 in Aging and Lung Fibrosis. *Am J Pathol* 186, 1712-1723.
- Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K., and Horio, Y. (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem* 282, 6823-6832.
- Tao, J., Wu, Q.Y., Ma, Y.C., Chen, Y.L., and Zou, C.G. (2017). Antioxidant response is a protective mechanism against nutrient deprivation in *C. elegans*. *Sci Rep* 7, 43547.
- Theodosiou, Z., Kasampalidis, I.N., Livanos, G., Zervakis, M., Pitas, I., and Lyroudia, K. (2007). Automated analysis of FISH and immunohistochemistry images: a review. *Cytometry A* 71, 439-450.
- Tomas, E., and Habener, J.F. (2010). Insulin-like actions of glucagon-like peptide-1: a dual receptor hypothesis. *Trends Endocrinol Metab* 21, 59-67.
- Toroser, D., and Sohal, R.S. (2007). Age-associated perturbations in glutathione synthesis in mouse liver. *Biochem J* 405, 583-589.
- Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B.J., Lee, B.H., Castrillon, D.H., Cullen, D.E., McDowell, E.P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I.R., Sears, C., *et al.* (2007). FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* 128, 325-339.
- Toyokuni, S., and Akatsuka, S. (2007). Pathological investigation of oxidative stress in the post-genomic era. *Pathol Int* 57, 461-473.
- Trapp, S., and Richards, J.E. (2013). The gut hormone glucagon-like peptide-1 produced in brain: is this physiologically relevant?. *Curr Opin Pharmacol* 13, 964-969.
- Tyner, S.D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., *et al.* (2002). p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415, 45-53.

- Uccellatore, A., Genovese, S., Dicembrini, I., Mannucci, E., and Ceriello, A. (2015). Comparison Review of Short-Acting and Long-Acting Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonists. *Diabetes Ther* 6, 239-256.
- Uchizono, Y., Takeya, R., Iwase, M., Sasaki, N., Oku, M., Imoto, H., Iida, M., and Sumimoto, H. (2006). Expression of isoforms of NADPH oxidase components in rat pancreatic islets. *Life Sci* 80, 133-139.
- Ungvari, Z., Tucsek, Z., Sosnowska, D., Toth, P., Gautam, T., Podlutzky, A., Csiszar, A., Losonczy, G., Valcarcel-Ares, M.N., Sonntag, W.E., *et al.* (2013). Aging-induced dysregulation of dicer1-dependent microRNA expression impairs angiogenic capacity of rat cerebrovascular endothelial cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 68, 877-891.
- Uranga, R.M., and Keller, J.N. (2010). Diet and age interactions with regards to cholesterol regulation and brain pathogenesis. *Curr Gerontol Geriatr Res*, 219683.
- Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A.T., and Norberg, E. (2017). The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 482, 426-431.
- Vigelso, A., Andersen, N.B., and Dela, F. (2014). The relationship between skeletal muscle mitochondrial citrate synthase activity and whole body oxygen uptake adaptations in response to exercise training. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 6, 84-101.
- Voet, D., J.G., V., and C.W., P. (2006). *Fundamentals of Biochemistry*, 2nd Edition edn (Madrid).
- Von Oetinger, A., and Trujillo, L.M. (2015). Metabolic benefits of exercise in the fasted state. *Rev Chil Nutr* 42, 145-150.
- Wallace, D.C., Fan, W., and Procaccio, V. (2010). Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu Rev Pathol* 5, 297-348.
- Wang, D.B., Kinoshita, C., Kinoshita, Y., and Morrison, R.S. (2014). p53 and mitochondrial function in neurons. *Biochim Biophys Acta* 1842, 1186-1197.
- Wang, F., Nguyen, M., Qin, F.X., and Tong, Q. (2007). SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging Cell* 6, 505-514.
- Wang, J., Zhang, L., Zhang, Y., Luo, M., Wu, Q., Yu, L., and Chu, H. (2015a). Transcriptional upregulation of HO-1 by EGB via the MAPKs/Nrf2 pathway in mouse C2C12 myoblasts. *Toxicol In Vitro* 29, 380-388.
- Wang, K., Li, L., Wu, J., Qiu, Q., Zhou, F., and Wu, H. (2015b). The different expression profiles of microRNAs in elderly and young human dental pulp and the role of miR-433 in human dental pulp cells. *Mech Ageing Dev* 146-148, 1-11.
- Wang, L., Chen, Y., Sternberg, P., and Cai, J. (2008). Essential roles of the PI3 kinase/Akt pathway in regulating Nrf2-dependent antioxidant functions in the RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 1671-1678.
- Wang, M. (2017). miR-433 protects pancreatic  $\beta$  cell growth in high-glucose conditions. *Mol Med Rep* 16, 2604-2610.

- Wasik, U., Milkiewicz, M., Kempinska-Podhorodecka, A., and Milkiewicz, P. (2017). Protection against oxidative stress mediated by the Nrf2/Keap1 axis is impaired in Primary Biliary Cholangitis. *Sci Rep* 7, 44769.
- Watson, J., D.; Baker, T. A.; Bell, S. P.; Gann, A.; Levine, M. et Losick, R (2004). *Molecular Biology of the Gene* 5<sup>th</sup> Edition edn (San Francisco: Benjamin Cummings).
- Wenger, R.H., Schlafli, P., Bortner, E., and Spielmann, P. (2009). The PAS-domain kinase PASKIN: a new sensor in energy homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 66, 876-883.
- Wu, L., and Derynck, R. (2009). Essential role of TGF-beta signaling in glucose-induced cell hypertrophy. *Dev Cell* 17, 35-48.
- Wu, X., Romero, D., Swiatek, W.I., Dorweiler, I., Kikani, C.K., Sabic, H., Zweifel, B.S., McKearn, J., Blitzer, J.T., Nickols, G.A., *et al.* (2014). PAS kinase drives lipogenesis through SREBP-1 maturation. *Cell Rep* 8, 242-255.
- Yi, J., and Luo, J. (2010). SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. *Biochim Biophys Acta* 1804, 1684-1689.
- You, H., Jang, Y., You-Ten, A.I., Okada, H., Liepa, J., Wakeham, A., Zaugg, K., and Mak, T.W. (2004). p53-dependent inhibition of FKHRL1 in response to DNA damage through protein kinase SGK1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14057-14062.
- Youle, R.J., and van der Bliek, A.M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337, 1062-1065.
- Yuan, J., Zhang, Z., Li, L., and Song, W. (2014). Resveratrol affects the expression of glutamate cysteine ligase in the kidneys of aged rats. *Exp Ther Med* 7, 1762-1766.
- Yuan, Y., Cruzat, V.F., Newsholme, P., Cheng, J., Chen, Y., and Lu, Y. (2016). Regulation of SIRT1 in aging: Roles in mitochondrial function and biogenesis. *Mech Ageing Dev* 155, 10-21.
- Zhang, D.D., Zhang, J.G., Wang, Y.Z., Liu, Y., Liu, G.L., and Li, X.Y. (2015a). Per-Arnt-Sim Kinase (PASK): An Emerging Regulator of Mammalian Glucose and Lipid Metabolism. *Nutrients* 7, 7437-7450.
- Zhang, H., Davies, K.J., and Forman, H.J. (2015b). Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radic Biol Med* 88, 314-336.
- Zhang, H., Liu, H., Davies, K.J., Sioutas, C., Finch, C.E., Morgan, T.E., and Forman, H.J. (2012). Nrf2-regulated phase II enzymes are induced by chronic ambient nanoparticle exposure in young mice with age-related impairments. *Free Radic Biol Med* 52, 2038-2046.
- Zhang, S.S., Wu, Z., Zhang, Z., Xiong, Z.Y., Chen, H., and Huang, Q.B. (2017). Glucagon-like peptide-1 inhibits the receptor for advanced glycation endproducts to prevent podocyte apoptosis induced by advanced oxidative protein products. *Biochem Biophys Res Commun* 482, 1413-1419.
- Zhou, L., Zhang, H., Davies, K.J., and Forman, H.J. (2017). Aging-related decline in the induction of Nrf2-regulated antioxidant genes in human bronchial epithelial cells. *Redox Biol* 14, 35-40.







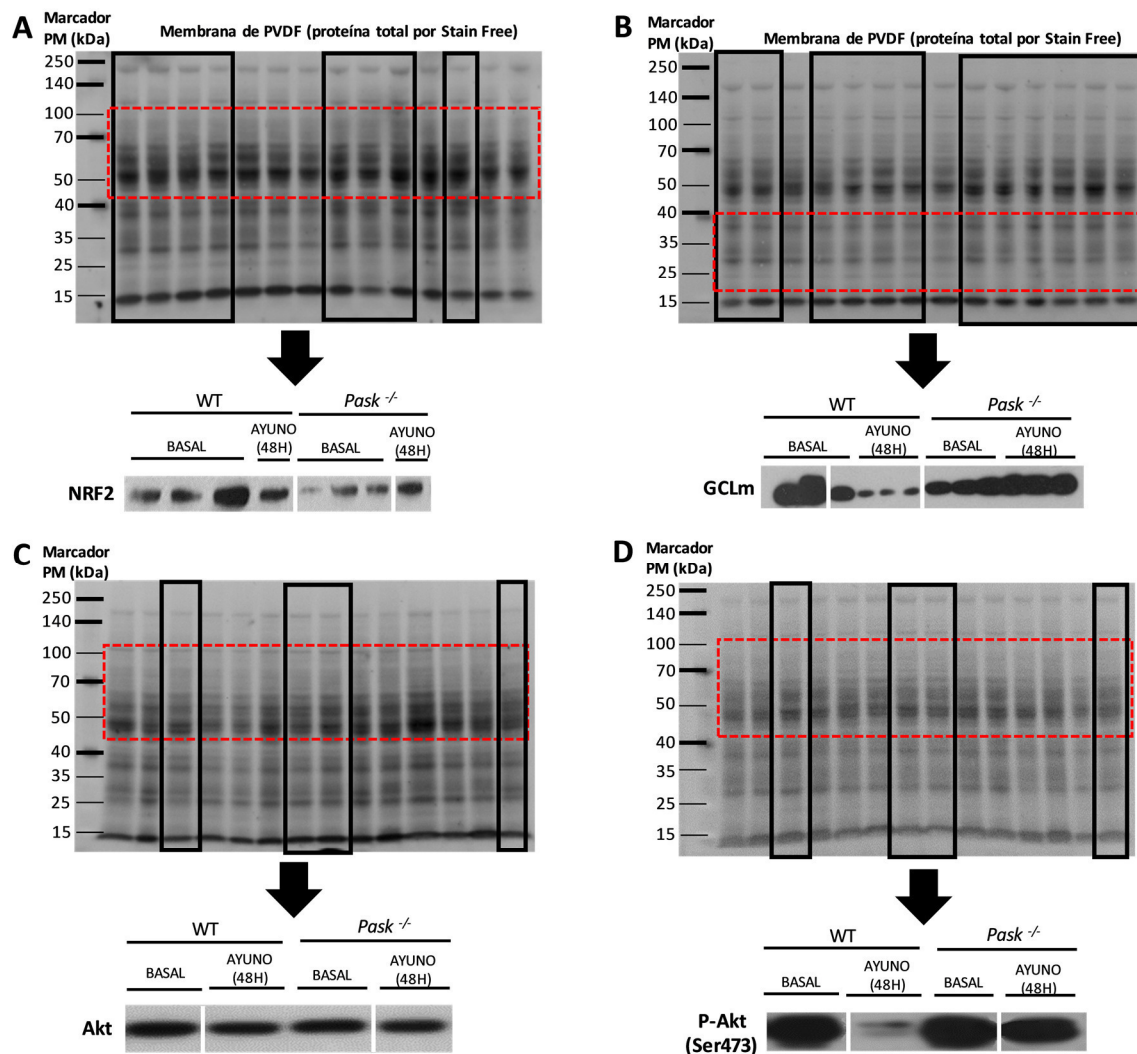
**Figura A1. Membranas representativas de PVDF e imágenes de los blots finales empleadas en los distintos experimentos.**

La figura recoge las membranas de PVDF empleadas en la detección de las proteínas **(A)** PGC-1α, COX-IV, **(B)** SIRT-1, **(C)** SOD-Mn y **(D)** p53, y las imágenes finales de los blots representativos de las diferentes figuras incluidas en esta tesis.

Las proteínas totales se visualizaron mediante la tecnología Stain-Free desarrollada por Bio-Rad. Ésta utiliza una química patentada de gel de poliacrilamida que hace que las proteínas sean fluorescentes directamente en el gel mediante una previa activación con iluminación UV durante 2 minutos, lo que permite la visualización inmediata de proteínas en las membranas.

Previamente, las membranas fueron recortadas, y cada una de las partes fueron incubadas con un anticuerpo distinto, de acuerdo con el peso molecular de la proteína a detectar (*recuadro rojo*). Los *recuadros negros* corresponden a las bandas recortadas que aparecen en la figura final.



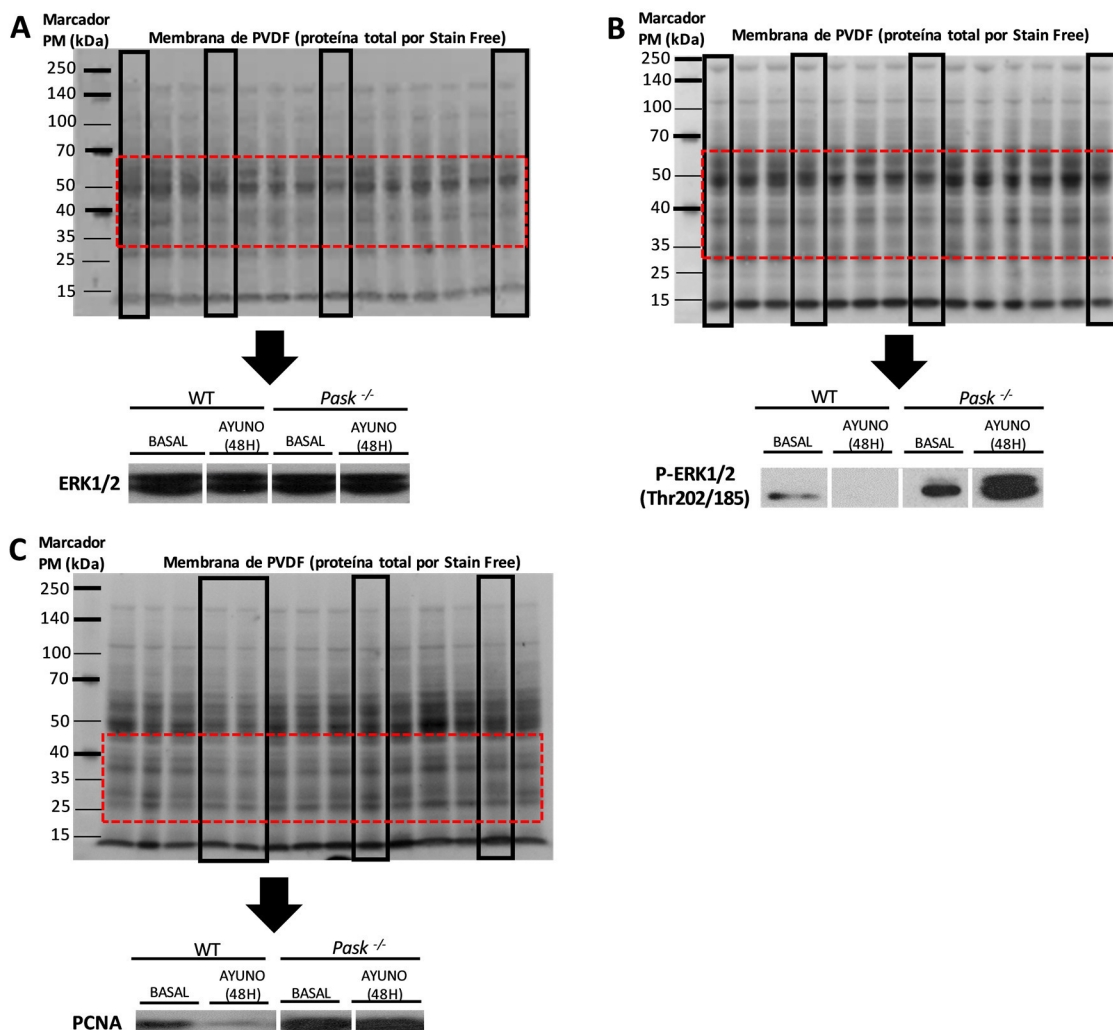


**Figura A2. Membranas representativas de PVDF e imágenes de los blots finales empleadas en los distintos experimentos.**

La figura recoge las membranas de PVDF empleadas en la detección de las proteínas **(A)** NRF2, **(B)** GCLm, **(C)** Akt y **(D)** P-Akt (Ser473), y las imágenes finales de los blots representativos de las diferentes figuras incluidas en esta tesis.

Las proteínas totales se visualizaron mediante la tecnología Stain-Free desarrollada por Bio-Rad. Ésta utiliza una química patentada de gel de poliacrilamida que hace que las proteínas sean fluorescentes directamente en el gel mediante una previa activación con iluminación UV durante 2 minutos, lo que permite la visualización inmediata de proteínas en las membranas.

Previamente, las membranas fueron recortadas, y cada una de las partes fueron incubadas con un anticuerpo distinto, de acuerdo con el peso molecular de la proteína a detectar (*recuadro rojo*). Los *recuadros negros* corresponden a las bandas recortadas que aparecen en la figura final.

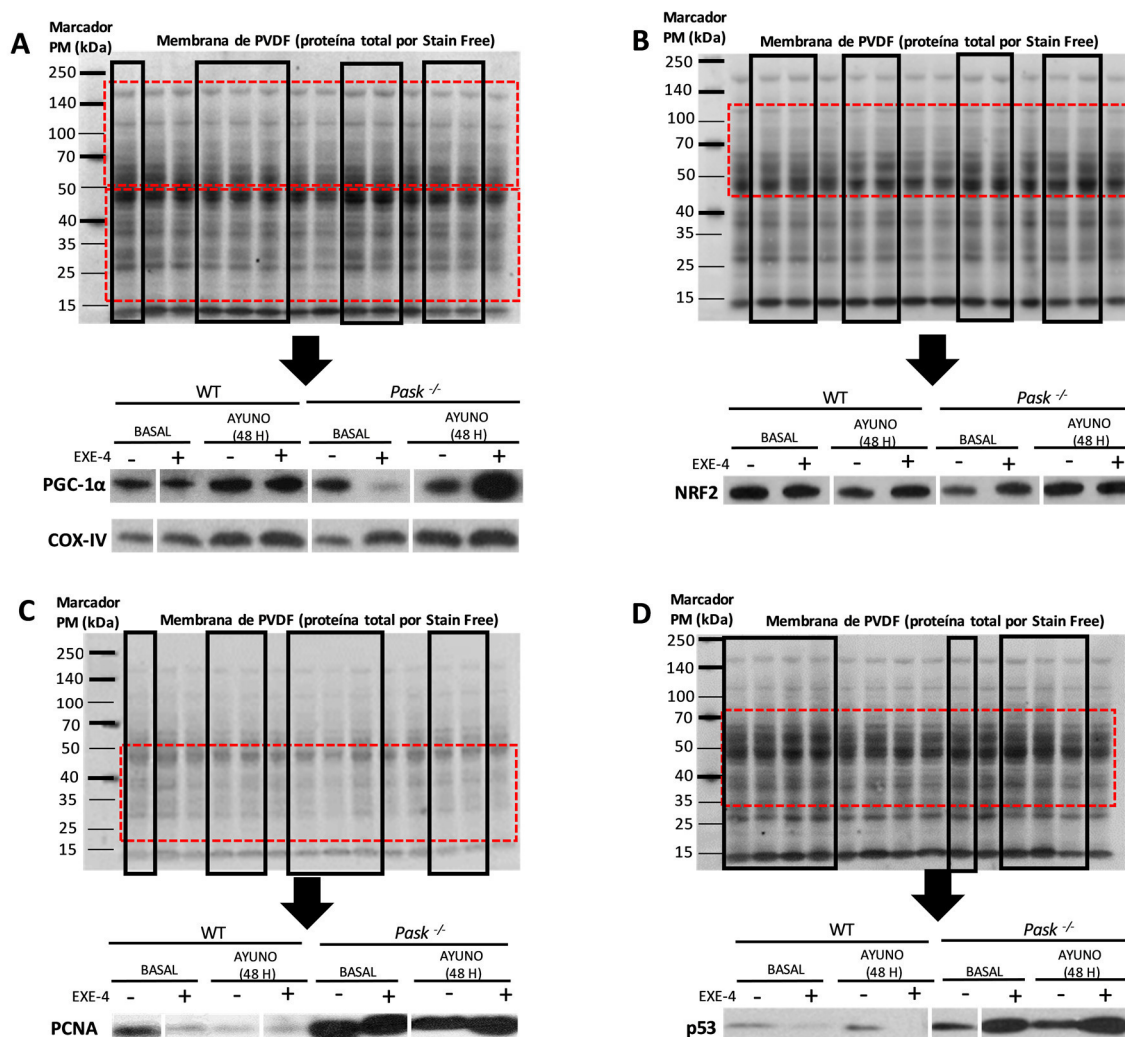


**Figura A3. Membranas representativas de PVDF e imágenes de los blots finales empleadas en los distintos experimentos.**

La figura recoge las membranas de PVDF empleadas en la detección de las proteínas **(A)** ERK1/2, **(B)** P-ERK1/2 (Thr202/185) y **(C)** PCNA, y las imágenes finales de los blots representativos de las diferentes figuras incluidas en esta tesis.

Las proteínas totales se visualizaron mediante la tecnología Stain-Free desarrollada por Bio-Rad. Ésta utiliza una química patentada de gel de poliacrilamida que hace que las proteínas sean fluorescentes directamente en el gel mediante una previa activación con iluminación UV durante 2 minutos, lo que permite la visualización inmediata de proteínas en las membranas.

Previamente, las membranas fueron recortadas, y cada una de las partes fueron incubadas con un anticuerpo distinto, de acuerdo con el peso molecular de la proteína a detectar (*recuadro rojo*). Los *recuadros negros* corresponden a las bandas recortadas que aparecen en la figura final.

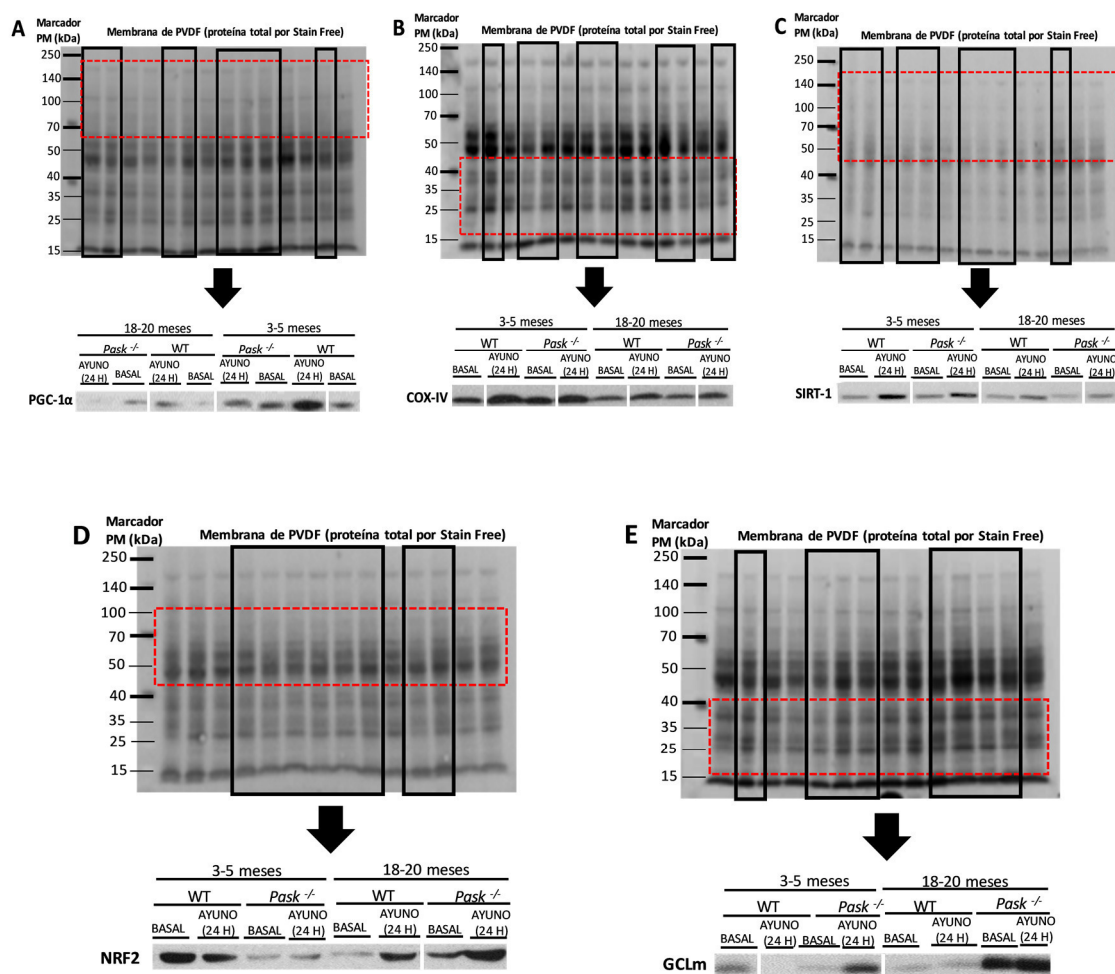


**Figura A4. Membranas representativas de PVDF e imágenes de los blots finales empleadas en los ensayos de exendina-4.**

La figura recoge las membranas de PVDF empleadas en la detección de las proteínas **(A)** PGC-1α, COX-IV, **(B)** NRF2, **(C)** PCNA y **(D)** p53, y las imágenes finales de los blots representativos de las figuras incluidas en los diferentes ensayos de exendina-4.

Las proteínas totales se visualizaron mediante la tecnología Stain-Free desarrollada por Bio-Rad. Ésta utiliza una química patentada de gel de poliacrilamida que hace que las proteínas sean fluorescentes directamente en el gel mediante una previa activación con iluminación UV durante 2 minutos, lo que permite la visualización inmediata de proteínas en las membranas.

Previamente, las membranas fueron recortadas, y cada una de las partes fueron incubadas con un anticuerpo distinto, de acuerdo con el peso molecular de la proteína a detectar (*recuadro rojo*). Los *recuadros negros* corresponden a las bandas recortadas que aparecen en la figura final.

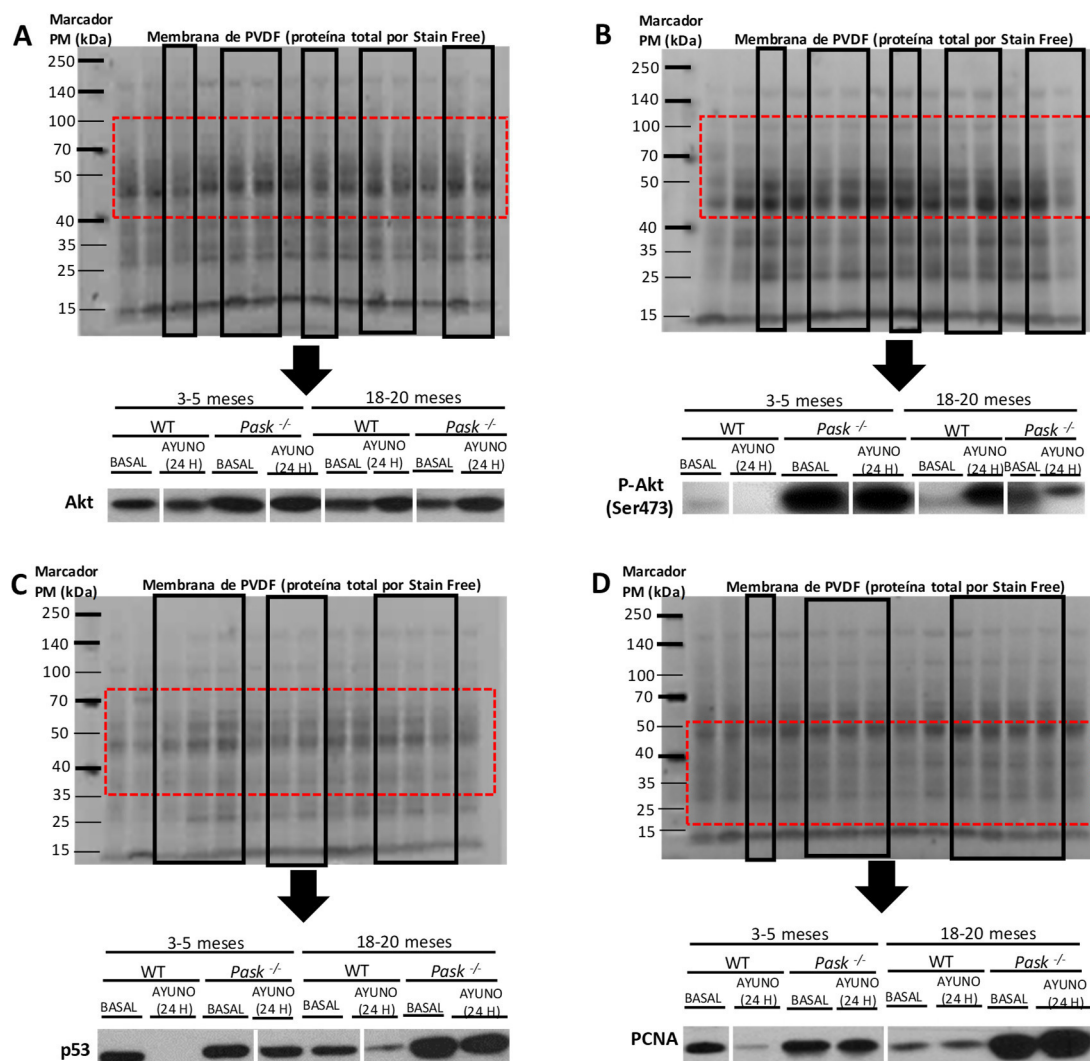


**Figura A5. Membranas representativas de PVDF e imágenes de los blots finales empleadas en los ensayos de envejecimiento.**

La figura recoge las membranas de PVDF empleadas en la detección de las proteínas **(A)** PGC-1α, **(B)** COX-IV, **(C)** SIRT-1, **(D)** NRF2 y **(E)** GCLm, y las imágenes finales de los blots representativos de las figuras incluidas en los diferentes ensayos de envejecimiento.

Las proteínas totales se visualizaron mediante la tecnología Stain-Free desarrollada por Bio-Rad. Ésta utiliza una química patentada de gel de poliacrilamida que hace que las proteínas sean fluorescentes directamente en el gel mediante una previa activación con iluminación UV durante 2 minutos, lo que permite la visualización inmediata de proteínas en las membranas.

Previamente, las membranas fueron recortadas, y cada una de las partes fueron incubadas con un anticuerpo distinto, de acuerdo con el peso molecular de la proteína a detectar (*recuadro rojo*). Los *recuadros negros* corresponden a las bandas recortadas que aparecen en la figura final.



**Figura A6. Membranas representativas de PVDF e imágenes de los blots finales empleadas en los ensayos de envejecimiento.**

La figura recoge las membranas de PVDF empleadas en la detección de las proteínas **(A)** Akt, **(B)** P-Akt (Ser473), **(C)** p53 y **(D)** PCNA, y las imágenes finales de los blots representativos de las figuras incluidas en los diferentes ensayos de envejecimiento.

Las proteínas totales se visualizaron mediante la tecnología Stain-Free desarrollada por Bio-Rad. Ésta utiliza una química patentada de gel de poliacrilamida que hace que las proteínas sean fluorescentes directamente en el gel mediante una previa activación con iluminación UV durante 2 minutos, lo que permite la visualización inmediata de proteínas en las membranas.

Previamente, las membranas fueron recortadas, y cada una de las partes fueron incubadas con un anticuerpo distinto, de acuerdo con el peso molecular de la proteína a detectar (*recuadro rojo*). Los *recuadros negros* corresponden a las bandas recortadas que aparecen en la figura final.

